

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Parasitología



TESIS DOCTORAL

Caracterización molecular y evaluación de la susceptibilidad de especies de *Leishmania*, circulantes en Bolivia, a nuevos fármacos y formulaciones

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pablo Estanislao Bilbao Ramos

Directores

Francisco Bolás Fernández
María Auxiliadora Dea Ayuela

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA
SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES DE *LEISHMANIA*, CIRCULANTES EN
BOLIVIA, A NUEVOS FÁRMACOS Y FORMULACIONES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADO POR:

Pablo Estanislao Bilbao Ramos

DIRECTORES:

Dr. Francisco Bolás Fernández

Dra. María Auxiliadora Dea Ayuela

Madrid, 2014

Tesis Doctoral:

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA
SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES DE *LEISHMANIA*,
CIRCULANTES EN BOLIVIA, A NUEVOS FÁRMACOS Y
FORMULACIONES**

Pablo Estanislao Bilbao Ramos

Directores:

Dr. Francisco Bolás Fernández

Dra. Maria Auxiliadora Dea Ayuela

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología

Madrid, 2014



Francisco Bolás Fernández, Doctor en Farmacia y Catedrático de Universidad del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y María Auxiliadora Dea Ayuela, Doctora en Farmacia y Profesora de Universidad del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES DE *LEISHMANIA*, CIRCULANTES EN BOLIVIA, A NUEVOS FÁRMACOS Y FORMULACIONES”** que presenta D. Pablo Estanislao Bilbao Ramos, ha sido realizada en dependencias del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo su supervisión y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada tesis doctoral.

En Madrid, a 31 de Marzo de dos mil catorce.

Dr. Francisco Bolás Fernández

Dra. María Auxiliadora Dea Ayuela

Fdo.

Fdo.

Con todo cariño:

A mis Padres Juan y Rufina

A mis hermanos Germán, Wilson y Filomena

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

La concesión de una beca doctoral del Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación - Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (MAEC - AECID), 2008 – 2012.

EL PROYECTO: A/024457/09 y A/030160/10 "Control de la leishmaniosis en Bolivia: Evaluación in vitro de la sensibilidad/resistencia de cepas autóctonas de Leishmania spp, a los tratamientos convencionales", 2009-2011.

EL PROYECTO: AP/039767/11 "Acciones preparatorias de fortalecimiento académico e investigación en el control de enfermedades parasitarias desatendidas: Leishmaniosis y parasitosis intestinales de alta prevalencia en Bolivia", 2011-2013.

Agradecimientos

Antes de poner el punto final en esta memoria doctoral que recopila el trabajo de investigación que realice durante mi estancia en Madrid, quiero agradecer a todas aquellas personas que durante estos años, me brindaron gentilmente sus conocimientos, su colaboración, ayuda y por sobre todo su valiosa amistad, que me hizo sentir como en mi propia casa.

Quiero empezar por mis directores de tesis, el Dr. Francisco Bolás Fernández y la Dra. Maria Auxiliadora Dea Ayuela, con quienes estoy infinitamente agradecido. Ambos depositaron su confianza en mi sin siquiera conocerme. Además, me transmitieron sus conocimientos y me dedicaron su valioso tiempo. Quiero decirles que admiro su gran capacidad intelectual, de trabajo y dedicación por la ciencia e investigación. Con total paciencia, me enseñaron a identificar los problemas, analizarlos y emplear métodos para resolverlos. Y como un valioso tesoro, me llevo la consigna de que solamente el trabajo constante e imperecedero es la única vía para conseguir nuestros objetivos, ¡Muchas gracias!.

También quiero agradecer a todo el personal que conforma el Departamento de Parasitología, empezando por el Director Dr. José Antonio Escario, a los profesores, el personal laboral y a mis compañeras de tesis: Cristina, Sandra, Vega, Mamen, Bertha y a Juan, quienes le dan alegría y mucha vida al Departamento, todas ellas siempre estuvieron dispuestas a colaborar y compartir momentos inolvidables.

Mi agradecimiento especial al Dr. Juan José Torrado Duran y a su gran equipo de trabajo, Loli, Helga y Carmen del Departamento Tecnología Farmacéutica, quienes prepararon las formulaciones farmacéuticas de anfotericina B y me cedieron gentilmente para realizar los experimentos. Ellas, compartieron conmigo sus valiosas experiencias y conocimientos que fueron de gran utilidad en la realización de esta memoria. Sin restar merito a nadie, me nace un

profundo agradecimiento a Loli, una profesional de primer nivel que me dio todo su aliento, apoyo y confianza, durante la realización de esta memoria.

A la Dra. Eugenia Gonzales Rosende y Cristina Galiana del Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Cardenal Herrera CEU, quienes sintetizaron las sulfonamidas.

Al Dr. Florencio M. Ubeira y su equipo de investigación de la Universidad Santiago de Compostela, los que sintetizaron los compuestos derivados de oxoisoaporfinas.

A la Dra. Isabel López Bazzocchi y Juan Carlos Ticona del Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” de la Universidad de La Laguna, quienes aislaron e identificaron los metabolitos secundarios de diferentes especies de *Piper spp.*

A la Dra. Ninoska Esther Flores y a su equipo de investigación del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, por haberme ofrecido todo su apoyo y colaboración mediante los proyectos de cooperación interuniversitaria anteriormente mencionados. Su gestión en la obtención de los aislados bolivianos de *Leishmania* y los productos de las plantas del género *Piper* fueron de vital importancia para la culminación de esta tesis. No quiero olvidar la valiosa y desinteresada colaboración del Dr. José Santalla, Jefe del Servicio de Parasitología del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) del Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia en la cesión de los datos y aislados de *Leishmania*.

Al Dr. Jorge Pérez Serrano del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Alcalá de Henares, a José y Antonio de la unidad de Microscopía de la misma universidad, por su colaboración en la realización de la Microscopía Electrónica de Barrido y de Transmisión.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
RESEÑA HISTÓRICA	13
EL PARÁSITO	14
CICLO BIOLÓGICO	15
ORGANIZACIÓN GENÓMICA	18
TAXONOMÍA	21
CARACTERIZACIÓN DE <i>LEISHMANIA</i>	23
TÉCNICAS FENOTÍPICAS DE CARACTERIZACIÓN	23
TÉCNICAS GENOTÍPICAS DE CARACTERIZACIÓN	24
TRANSMISIÓN	30
FORMAS CLÍNICAS	33
EPIDEMIOLOGÍA	36
CONTROL FARMACOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD	41
DESARROLLO DE NUEVAS ALTERNATIVAS FARMACOTERAPÉUTICAS	57

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	73
OBJETIVOS	75
MATERIAL Y MÉTODOS	79
REACTIVOS GENERALES	81
AISLADOS DE <i>LEISHMANIA</i>	82
PROCEDIMIENTOS	84
<i>IDENTIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS-1 MEDIANTE PCR-RFLP</i>	<i>85</i>
<i>IDENTIFICACIÓN DE HSP70-I MEDIANTE PCR-RFLP</i>	<i>87</i>
<i>IDENTIFICACIÓN DEL CITOCROMO B MEDIANTE PCR-RFLP Y SECUENCIACIÓN</i>	<i>89</i>
RESULTADOS	93
IDENTIFICACIÓN POR PCR - RFLP DE ESPACIADORES ITS1	95
IDENTIFICACIÓN POR PCR - RFLP DE LA REGIÓN DEL GEN HSP70-I	97
IDENTIFICACIÓN POR PCR - RFLP DE LA REGIÓN DEL GEN CIT-B	101
CARACTERIZACIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN PARCIAL DEL GEN DEL CIT-B	103
DISCUSIÓN	119

CAPÍTULO II

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL CRIBADO FARMACOLÓGICO	131
OBJETIVOS	133
MATERIAL Y MÉTODOS	137

REACTIVOS	138
CÉLULAS Y PARÁSITOS	139
MÉTODOS	140
<i>CULTIVO DE PARÁSITOS</i>	<i>140</i>
<i>CULTIVO DE CÉLULAS MACRÓFAGOS J774.....</i>	<i>140</i>
<i>CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS PARÁSITOS</i>	<i>140</i>
<i>CORRELACIÓN LINEAL Y SENSIBILIDAD DE LOS MÉTODOS COLORIMÉTRICOS Y</i>	
<i>FLUORIMÉTRICOS.....</i>	<i>141</i>
<i>INFECCIÓN IN VITRO DE MACRÓFAGOS J774 CON PROMASTIGOTES DE</i>	
<i>LEISHMANIA</i>	<i>144</i>
<i>LISIS SELECTIVA DE MACRÓFAGOS.....</i>	<i>146</i>
<i>COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE CRIBADO.....</i>	<i>147</i>
RESULTADOS	151
CURVA DE CRECIMIENTO	153
SENSIBILIDAD Y LINEALIDAD DE LOS MÉTODOS DE CRIBADO	154
<i>Método colorimétrico XTT.....</i>	<i>154</i>
<i>Método colorimétrico de la fosfatasa alcalina.....</i>	<i>156</i>
<i>Método Fluorimétrico del SYBR-Green I</i>	<i>158</i>
<i>Método Fluorimétrico de la resazurina.</i>	<i>160</i>
INFECCIÓN IN VITRO DE MACRÓFAGOS J774 CON PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA</i> ..	162
LISIS SELECTIVA DE MACRÓFAGOS.....	164
CORRELACIÓN ENTRE LA SUPERVIVENCIA Y LA EMISIÓN DE FLUORESCENCIA.	165
VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE CRIBADO IN VITRO.....	166
<i>VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VITRO SOBRE PROMASTIGOTES.....</i>	<i>166</i>
<i>VALORACION DE LA ACTIVIDAD IN VITRO SOBRE AMASTIGOTES INTRACELULARES</i>	
.....	170
DISCUSIÓN	173

CAPÍTULO III

CRIBADO FARMACOLÓGICO BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS	
FRENTE A <i>LEISHMANIA</i>	189
OBJETIVOS.....	191
MATERIAL Y MÉTODOS.....	195
<i>MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS GENERALES.....</i>	<i>197</i>
<i>LINEA CELULAR Y AISLADOS DE LEISHMANIA.....</i>	<i>197</i>
<i>COMPUESTOS.....</i>	<i>197</i>
MÉTODOS	199
<i>CULTIVOS DE PARÁSITOS Y DE MACRÓFAGOS-J774.....</i>	<i>199</i>
<i>CRIBADO FARMACOLÓGICO IN VITRO SOBRE PROMASTIGOTES</i>	<i>199</i>
<i>CITOTOXICIDAD CELULAR IN VITRO SOBRE MACRÓFAGOS-J774</i>	<i>200</i>
<i>CRIBADO FARMACOLÓGICO IN VITRO SOBRE AMASTIGOTES.....</i>	<i>201</i>
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	203

REACTIVOS	203
MÉTODOS	205
<i>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO</i>	205
<i>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN</i>	207
MODELO <i>IN VIVO</i> DE LEISHMANIOSIS CUTÁNEA CRÓNICA	211
<i>ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</i>	211
<i>MÉTODO</i>	211
RESULTADOS	213
SUSCEPTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> A LOS FÁRMACOS DE REFERENCIA.	215
CRIBADO FARMACOLÓGICO <i>IN VITRO</i>	219
<i>CRIBADO FARMACOLÓGICO IN VITRO DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS DE ANFOTERICINA B</i>	220
<i>CRIBADO FARMACOLÓGICO IN VITRO DE PRODUCTOS OBTENIDOS DE PLANTAS MEDICINALES</i>	225
<i>CRIBADO FARMACOLÓGICO IN VITRO DE COMPUESTOS DE SÍNTESIS QUÍMICA</i> ...	233
ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	247
DISCUSIÓN	253
CONCLUSIONES	283
BIBLIOGRAFÍA.....	289
ANEXOS	329
ANEXO 1	331
<i>ESTRUCTURAS QUÍMICAS</i>	331
<i>ESTRUCTURAS DE DERIVADOS DE SULFONAMIDAS</i>	334
<i>ESTRUCTURAS DE DERIVADOS DE OXOISOAPORFINAS</i>	336
ANEXO 2	341
<i>PATENTES</i>	341
ANEXO 3	343
<i>PUBLICACIONES</i>	343

RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad causada por más de 20 especies del género *Leishmania* que causan diferentes patologías conocidas como leishmaniosis visceral (LV), leishmaniosis cutánea (LC) y leishmaniosis mucocutánea (LMC). Es una enfermedad prevalente en 98 países y afecta a más de 1.3 millones de personas. En Latinoamérica, es una enfermedad endémica y Bolivia registró la mayor tasa de incidencia en 2006 (33 casos por cada 100.000 habitantes), de los cuales más del 50% se localiza en la región subandina del Departamento de La Paz.

La gravedad de la enfermedad se asocia a la variabilidad intrínseca de *Leishmania*, los fracasos terapéuticos, la resistencia adquirida y los efectos adversos de los tratamientos convencionales. En este contexto, los expertos de la Organización Mundial de la Salud, han exhortado a las instituciones públicas y privadas a aunar esfuerzos en la identificación de las especies circulantes en cada región, priorizar las investigaciones en la búsqueda de alternativas terapéuticas e investigar los factores asociados a los fallos terapéuticos y de resistencia.

La presente memoria de tesis doctoral, fue diseñada para identificar las especies de *Leishmania* circulantes en el Departamento de La Paz (Bolivia) y evaluar su susceptibilidad farmacológica *in vitro*. Además, se incorpora un tercer objetivo dirigido a la búsqueda de alternativas terapéuticas, claves para el futuro tratamiento de la leishmaniosis.

Se obtuvieron 55 aislados de *Leishmania*, de pacientes con lesiones cutáneas y mucocutáneas, en el servicio de Parasitología del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA), Bolivia. Los aislados se mantuvieron en cultivos mediante pases periódicos, se purificó el ADN genómico y para su caracterización molecular se emplearon tres marcadores: los espaciadores internos de transcripción (ITS-1) del rARN, las regiones que codifican para la proteína de choque térmico (HSP70-I) y los genes mitocondriales del citocromo b (cit-b). Se

amplificaron mediante PCR y los productos resultantes fueron digeridos mediante endonucleasas de restricción. Además, se secuenciaron los amplicones del cit-b.

Para la evaluación de la susceptibilidad farmacológica y búsqueda de alternativas terapéuticas, se evaluó la sensibilidad y linealidad de diferentes métodos espectroscópicos (colorimétricos y fluorimétricos). Se diseñó un modelo de infección de macrófagos J774 con promastigotes de *Leishmania* y se establecieron las condiciones de lisis selectiva de macrófagos para la liberación de amastigotes intracelulares y su posterior transformación en promastigotes. Para su validación, se comparó el método fluorimétrico con el recuento óptico. Después, se evaluó la susceptibilidad en promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania*.

Los resultados obtenidos mediante la combinación de los diferentes marcadores moleculares, permitieron identificar tres entidades taxonómicas de *Leishmania* circulando en Bolivia. Así, el 65,5 % de los aislados analizados se correspondían con el perfil de *L. (V.) braziliensis*, 27,3 % con el complejo *L. (Leishmania) mexicana* y 7,3 % con *L. (V.) lainsoni*. Además, el análisis de las secuencias del cit-b permitió identificar polimorfismos intraespecíficos en *L. (V.) braziliensis* y en *L. (L.) mexicana*.

En la validación de métodos para el cribado farmacológico en promastigotes, se seleccionó el método de la resazurina porque cumple los parámetros de sensibilidad y linealidad. Es un método, simple, reproducible y de bajo coste que presenta una adecuada correlación con el método “gold standar”. Para la validación del método fluorimétrico, útil en el cribado farmacológico en amastigotes intracelulares, inicialmente se determinó el protocolo de infección a la relación 1:10 (macrófago: promastigote), a día 7 post-inóculo y se estableció la concentración de dodecil sulfato sodico (SDS 0,006%) para la lisis selectiva de macrófagos, que permitió la liberación de amastigotes intracelulares, su transformación en promastigotes y posterior proliferación que fue cuantificada mediante el método de la resazurina.

La evaluación de la susceptibilidad farmacológica de aislados de *Leishmania* procedentes de pacientes bolivianos, ha mostrado que todos los aislados fueron altamente susceptibles a la Fungizona® (0,23 – 0,93 µg/mL), en cambio frente a la miltefosina la susceptibilidad fue muy variable, siendo la más susceptible *L. (L.) mexicana* (0,86 µg/mL), seguida de *L. (V.) lainsoni* y *L. (V.) braziliensis* (30,56 µg/mL). Frente al tratamiento con Evanta, no se observaron diferencias significativas entre las especies, sin embargo los aislados de *L. (L.) mexicana* fueron más susceptibles que los aislados de las especies del subgénero *L. (Viannia)*.

En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para la leishmaniosis, se han seguido tres posibles estrategias: evaluación de nuevas formulaciones de anfotericina B, búsqueda de compuestos de síntesis química y productos derivados de plantas medicinales.

Se evaluó la actividad *in vitro* de formulaciones de anfotericina B (AnB), en diferentes estados de agregación (monomérica, dimérica y poliagregada), libres o encapsulados en microesferas de albúmina, además de una formulación en gel de AnB monomérica en complejos de γ -ciclodextrinas. De todas ellas, se puede destacar la actividad *in vitro* de la AnB poliagregada libre o encapsulada en microesferas de albúmina, además del gel de AnB monomérica en complejos de γ -ciclodextrinas por su reducida citotoxicidad. La microscopía electrónica de barrido de promastigotes de *L. infantum*, tratados con los 3 estados de agregación de AnB, evidenció diferencias en los daños superficiales, siendo la más agresiva, la AnB dimérica, seguida de la monomérica y la poliagregada.

También se evaluó la actividad leishmanicida de productos y metabolitos secundarios de diferentes especies de *Piper*, de los que se destaca la potente actividad de las chalconas pdP5 (2',3-dihidroxi-4',6',5-trimetoxi-chalcona), pdP23 (2',4'-dihidroxi-3,6'-dimetoxi-chalcona) y pdP24 (2',3-dihidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona) aisladas de *Piper delineatum* y las amidas ppP12 ([E]-piplartina) y ppP13 ([Z]-piplartina), aisladas de *Piper pseudoarboreum*.

De los compuestos de síntesis química, es de interés la actividad leishmanicida de las sulfonamidas 1a (4-Nitro-N-pirimidin-2-il bencen-sulfonamida), 2d (4-Cloro-N-5-metil-tiazol-2-il-bencen-sulfonamida) y 1n (4-Nitro-N-pirazin-2-il-bencen-sulfonamida). Mediante la microscopía electrónica de barrido y transmisión se evidenciaron daños ultraestructurales en promastigotes de *L. infantum* localizados a nivel del núcleo, mitocondria y bolsa flagelar. También hay que destacar la actividad de las sulfonamidas 6d (4-Fluoro-N-isoquinolin-5-il-bencen-sulfonamida), 8c (N-(2-metil-1H-indol-5-il)-bencen-sulfonamida), 9c (N-(1H-Indazol-5-il)-bencen-sulfonamida), 12c (N-benzotiazol-6-il-bencen-sulfonamida) y 14d (3-metil-1-(naftalen-1-sulfonyl)-piperidina) por su acción leishmanicida sin mostrar efectos citotóxicos.

De los compuestos derivados de oxoisoaporfina hay que destacar la actividad, en promastigotes y amastigotes intracelulares, de OXO1 (2,3-dihidro-7H-dibenzo [de,h] quinolin-7-ona), OXO13 (2,3,8,9,10,11-hexahidro-7H-dibenzo [de,h] quinolin-7-ona), A4 (6-metoxi-7H-benzo[e]perimidin-7-ona) y A8 (6-hidroxi-2-metil-7H-benzo[e]perimidin-7-ona).

Finalmente, se evaluó la eficacia de formulaciones tópicas en pomada, crema y gel, de anfotericina B monomérica en complejos de γ -ciclodextrinas en un modelo *in vivo* de leishmaniosis cutánea crónica por *L. amazonensis* en el criceto dorado. Las formulaciones en pomada y en gel disminuyeron moderadamente el progreso de la lesión.

En conclusión, esta memoria describe la circulación de 3 taxones de *Leishmania* como los agentes causales de la leishmaniosis en Bolivia. También se resalta la marcada variación de la susceptibilidad a los tratamientos de elección entre especies e intraespecies, especialmente en el subgénero *Leishmania* (*Viannia*). Además, se propone una selección de compuestos y formulaciones potencialmente activos frente a diferentes especies de *Leishmania* como posibles alternativas terapéuticas.

SUMMARY

Leishmaniosis is an infectious disease caused by over 20 *Leishmania* species resulting in multiple clinical forms of the disease: visceral (VL), cutaneous (CL) and mucocutaneous (MCL). Leishmaniosis are prevalent in 98 countries and affect more than 1.3 million of people worldwide. Is an endemic disease in Latin America and Bolivia has the highest incidence of CL, with 33 cases per 100,000 population reported in 2006. More than 50% of these cases are localized in subandean region of the department La Paz being one of the biggest affected areas in the country.

Conventional drug therapeutic failure and appearance of resistance can be associated to the high variability of *Leishmania spp* could be lead in severity of the disease. The WHO (World Health Organization) is actively promoting the joining of public and private institutions in Bolivia with the aim of discovering new cost-effective treatments and identifying which factors are related to drug failure and resistance.

The aim of this Thesis was to identify all the different *Leishmania spp.* localised in the Department of La Paz (Bolivia) and assess their *in vitro* drug susceptibility. Also, the development of new cost-effective treatments was studied.

55 *Leishmania* isolates from patients who had been diagnosed with cutaneous and mucocutaneous Leishmaniosis by the Parasitology laboratory of National Institute of Laboratory Health (INLASA) in Bolivia were obtained. Parasites were kept in culture by periodically passaging. DNA was purified and analysed using three molecular markers: internal transcribed spacer (ITS-1), heat shock protein (HSP70-I) and cytochrome b gene (cyt-b). DNA was amplified using PCR and the obtained fragments were digested by restriction endonucleases. PCR products of cyt-b also were sequenced.

Sensitive and linearity of several spectroscopic methods (colorimetric and fluorometric) were tested to assess drug screening and drug susceptibility. A

protocol of macrophage infection with *Leishmania* promastigotes was developed. Selective lyses were applied to intracellular amastigote-rescue followed by their transformation into promastigotes. In order to validate fluorometric methods were compared to optical methods. Finally they were used to assess drug susceptibility in promastigotes and intracellular amastigotes.

Our results confirmed that three *Leishmania* taxa are spread in Bolivia: *L. (V.) braziliensis* (65.5%), *L. (Leishmania) mexicana* (27.3%) and *L. (V.) lainsoni* (7.3%). Different *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) mexicana* polymorphisms were identified using cyt-b sequences.

The resazurin assay was used to perform the pharmacological screening because of its good sensitivity and linearity. The advantages of this method are: low cost, reproducibility, easiness and good correlation with the gold standard method. In order to validate the fluorometric method used in the pharmacological screening of intracellular amastigotes, it was necessary to study the infection (ratio 1:10 macrophage: promastigote) at 7 day of the growth curve in culture and the required amount of dodecyl sulphate (0.006%) to cause the selective lyses of macrophages and rescue-intracellular amastigotes followed by quantification.

All *Leishmania* isolates from patients were highly susceptible to Fungizone (0.23-0.93 µg/mL) unlike miltefosie which exhibited a variable *in vitro* activity: *L. (L.) mexicana* (0,86 µg/mL) > *L. (V.) lainsoni* > *L. (V.) braziliensis* (30,56 µg/mL). There were no statistical differences after treatment with Evanta although *L. (L.) mexicana* was more susceptible than *L. (Viannia)* species.

Three different strategies were followed in order to identify novel treatments for leishmaniasis: (i) new amphotericin B formulations, (ii) novel chemically synthesized compounds and (iii) compounds derived from medicinal plants.

Different amphotericin B aggregation states were assessed: monomer, dimer and poly-aggregated. All of them were also examined after encapsulation in albumin microspheres. The monomer was also complexed with γ-cyclodextrins. Among all

the formulations, free and encapsulated poly-aggregated amphotericin B and monomeric amphotericin B complexed with γ -cyclodextrins resulted in high activity against and lower toxicity. Morphological damage in *L. infantum*, after 3 amphotericin B aggregation treatments were assessed by scanning electron microscopy (SEM). Dimeric amphotericin B caused the most severe damage followed by the monomer and finally by the poly-aggregate.

A set of 3 chalcones from *Piper delineatum* pdP5 (2',3-dihydroxy-4',6',5-trimethoxy-chalcone), pdP23 (2',4'-dihydroxy-3,6'-dimethoxy-chalcone) and pdP24, and amides from *Piper pseudoarboreum* ppP12 [(E)-piplartine] and ppP13 [(Z)-piplartine] showed Leishmanicidal activity against promastigotes as well as intracellular amastigotes forms of *Leishmania spp.* These metabolites are high activity, more than the reference drug miltefosine.

Regarding the novel chemically synthesised compounds, the sulphonamides: 1a (4-Nitro-N-pyrimidin-2-yl benzenesulfonamide), 2d (4-Chloro-N-5-methyl-1,2,4-triazol-2-yl benzenesulfonamide) and 1n (4-Nitro-N-pyrazin-2-yl benzenesulfonamide) exhibited the greatest leishmanicidal activity. Scanning and Transmission Electron Microscope analysis revealed that damages occur in the nucleus, mitochondria and flagellar pocket. Another sulfonamide series, 6d (4-Fluoro-N-isoquinolin-5-yl benzenesulfonamide), 8c (N-(2-methyl-1H-indol-5-yl)-benzenesulfonamide), 9c (N-(1H-Indazol-5-yl)-benzenesulfonamide), 12c (N-benzotriazol-6-yl benzenesulfonamide) y 14d (3-methyl-1-(naphthalen-1-sulfonyl)-piperidine) also exhibited a potent leishmanicidal activity but without causing toxicity.

Synthetic oxoisoaporphine compounds showed a high leishmanicidal activity too such as: OXO1 (2,3-dihydro-7H-dibenzo [de,h] quinolin-7-one), OXO 13 (2,3,8,9,10,11-hexahydro-7H-dibenzo [de,h] quinolin-7-one), A4 (6-methoxy-7H-benzo[e]perimidin-7-one) and A8 (6-hydroxy-2-methyl-7H-benzo[e]perimidin-7-one).

In vivo efficacy in a chronic model of cutaneous leishmaniasis in hamster infected with *L. amazonensis* was developed to test the efficacy of different topical amphotericin B- γ -cyclodextrin formulations (ointment, cream and gel). Ointment and gel reduce the lesion size progress exhibited a moderated activity.

In conclusion, this thesis has allowed to: (i) identify the three majoritarian *Leishmania* taxon's in Bolivia; (ii) study the differences in pharmacological susceptibility between several species and intra-species mainly *L. (Viannia)* and (iii) to discover novel therapeutics against *Leishmania*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

RESEÑA HISTÓRICA

En el viejo mundo la leishmaniosis es conocida desde la antigüedad. Así, en las tablas del rey Ashurbanipal (último rey de Asiria 668 a.C. - 627 a.C.), se encuentran los primeros datos que indican su presencia en Oriente Medio (Manson-Bahr 1996). Sin embargo, la primera descripción clínica de la forma cutánea, más conocida como “botón de oriente”, data de 1756, cuando Alexander Russell describe una lesión ulcerosa en un paciente nativo, en Turquía (Cox 2002). Posteriormente, en 1824, en la región de Jesore-India se describe un caso clínico de leishmaniosis visceral, también conocida como “*Kala-azar*” o “*fiebre negra*”(Cox 2002).

A pesar de las distintas descripciones de la enfermedad por diferentes investigadores, el descubrimiento de *Leishmania* se atribuye al Dr. James Homer Wright por su descripción en 1903 de las “*úlceras de Delhi*” (Wright 1903). Ese mismo año, Sir William Boog Leishman y Charles Donovan, ambos de forma independiente, identificaron unos cuerpos esféricos en biopsias viscerales de bazo y lesiones cutáneas de pacientes con *Kala-azar* y los denominaron “*Cuerpos de Leishman-Donovan*” (Kean et al. 1978; Alvar-Ezquerro 2001; Cook 2007; Dutta 2008).

También, en el Nuevo Mundo, la leishmaniosis parece ser una enfermedad presente desde la antigüedad. En Perú y Ecuador se han encontrado cerámicas preincaicas (Huacos) que datan del siglo I d.C. en las que se describen gráficamente malformaciones faciales y de la piel (Lainson 2010) atribuibles a *Leishmania*. Entre los años



Fig. 1. Gaspar Vianna (1885-1914)
(Suassuna 2006).

1906 a 1916, Gaspar Vianna (Fig. 1) en Brasil estudia las formas amastigotes de la

leishmaniosis tegumentaria americana concluyendo que son distintas a las formas descritas en el viejo mundo y las denomina *Leishmania braziliensis* (Suassuna 2006).

EL PARÁSITO

Leishmania es un protozoo polimórfico que presenta dos formas bien diferenciadas: los amastigotes en mamíferos y los promastigotes en el vector invertebrado (Fig. 2 y 3) (Molyneux & Killick-Kendrick 1987; Alvar-Ezquerria 2001; Bañuls et al. 2007).

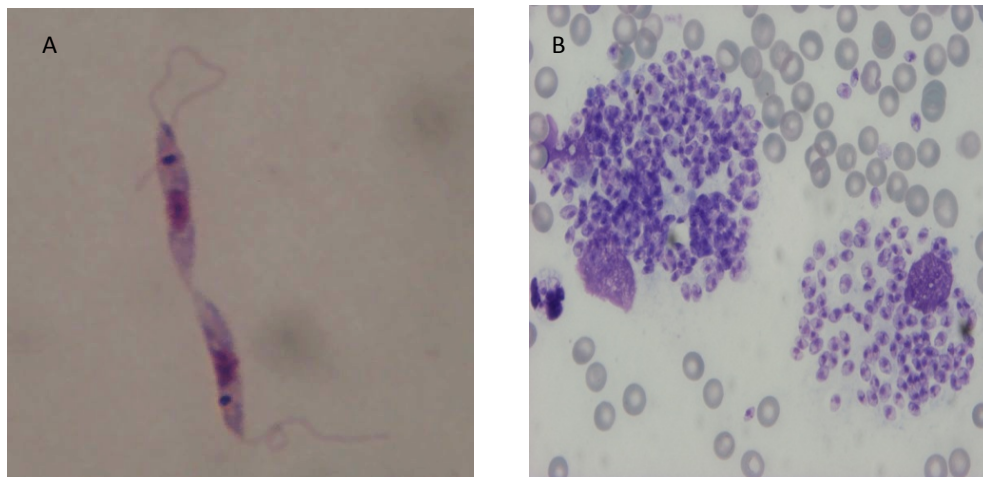


Fig. 2. Tinción giemsa: A) promastigotes; B) amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*

Los amastigotes son formas intracelulares obligadas, que invaden células fagocíticas de mamíferos. Son ovoides e inmóviles, miden de 2-4 μm de diámetro, presentan un núcleo bien definido y un kinetoplasto, adyacente al extremo distal de la bolsa flagelar se encuentra un diminuto flagelo. En cambio, los promastigotes son formas extracelulares que se encuentran en el tracto gastrointestinal del vector invertebrado. Presentan un cuerpo elongado con un flagelo grande que le confiere movilidad y miden entre 5 y 20 μm de largo (Molyneux & Killick-Kendrick 1987).

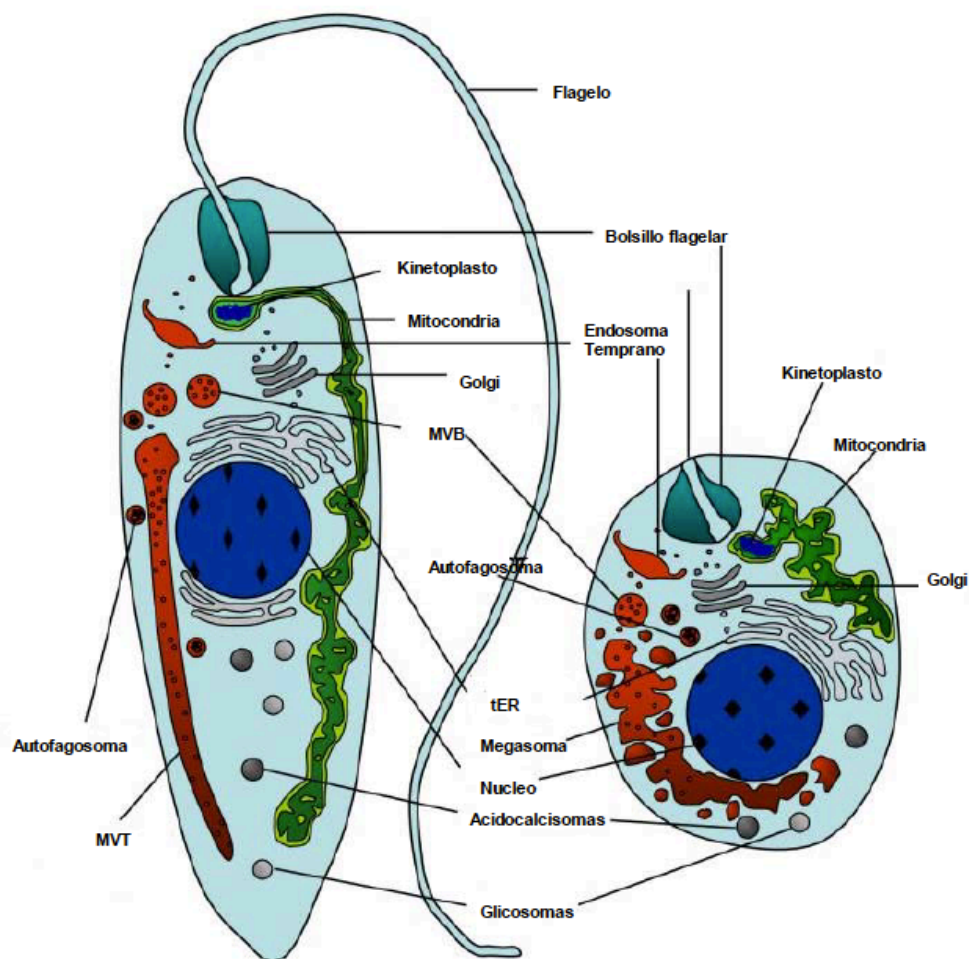


Fig. 3. Representación ultraestructural de *Leishmania*. MVT (túbulo multivesicular); MVB (cuerpos multivesiculares); tER (retículo endoplasmico) (McConville et al. 2002).

CICLO BIOLÓGICO

Las especies del subgénero *Leishmania* (*Leishmania*) se desarrollan en la región suprapilórica de las hembras hematófagas de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. En cambio, las especies del subgénero *Leishmania* (*Viannia*) no entran en el intestino grueso y limitan su desarrollo al intestino medio anterior en la región peripilórica de sus vectores naturales (*Lutzomyia* spp.). Inmediatamente después de que la hembra hematófaga de los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia* ingiera sangre infectada con amastigotes, se inicia el **ciclo extracelular** (Fig. 4). Los macrófagos infectados transportados en la sangre

son alojados y lisados en el tracto digestivo del vector, donde se liberan las formas amastigotes que se adhieren a las microvellosidades de la luz del epitelio intestinal anterior del abdomen y en las primeras 24 horas se transforman en promastigotes procíclicos, las formas más pequeñas de los promastigotes. Se caracterizan por presentar un flagelo muy corto, agruparse en rosetas, secretar quitinasa y enzimas hidrolíticas, que les van a permitir escapar de la matriz peritrófica e invadir el intestino medio anterior. Durante el segundo y tercer día se multiplican aceleradamente en el tracto gastrointestinal y se transforman en promastigotes nectomonas que son formas elongadas de un tamaño entre 12 y 30 μm de largo. Son formas migratorias muy adherentes que se acumulan en las microvellosidades de las células epiteliales del extremo anterior de la matriz peritrófica. Entre el tercer y séptimo día se transforman en promastigotes leptomonas que miden entre 6 y 8 μm de largo, que se acumulan en la luz del intestino medio torácico donde secretan un gel rico en proteofosfoglicanos (PSG) que es fundamental en el proceso de infección del mamífero ya que provoca la regurgitación durante la ingesta de sangre. Algunas de las formas nectomonas y leptomonas invaden la región cuticular de la válvula estomoidal, donde se transforman en promastigotes haptomonas que miden entre 5 y 8 μm de largo, las cuales se adhieren al revestimiento de la superficie de las válvulas estomoidales. Algunos promastigotes haptomonas se transforman en promastigotes metacíclicos que son formas pequeñas y delgadas muy móviles, con un flagelo que mide el doble de su cuerpo y no son capaces de multiplicarse. Estos migran al esófago, faringe y probóscide donde estarán listos para infectar a mamíferos (Molyneux & Killick-Kendrick 1987; Sacks & Kamhawi 2001; Vannier-Santos et al. 2002; Jamjoom et al. 2004; Bates 2007).

El **ciclo intracelular** se inicia cuando la hembra hematófaga vuelve a picar a un mamífero (Fig. 4), provocándole un ligero hematoma que lesiona la epidermis, dermis y vasos capilares, ingurgita sangre y desde la probóscide e intestino medio regurgita PSG y entre 10 a 1000 promastigotes metacíclicos (forma infectante).

Los promastigotes metacíclicos ricos en contenido de proteofosfoglicanos (PPG) y glicoproteína 63 (gp63), libres en el tejido dérmico, se adhieren a los macrófagos preferentemente por su flagelo. Para entrar en el macrófago, el promastigote metacíclico debe unirse a los receptores del complemento CR1 y CR3 que reducen el riesgo del estallido respiratorio. Los lipofosfoglicanos (LPG) del parásito inhiben la enzima proteinkinasa-C (PkC), suprimiendo la producción de óxido nítrico y de especies reactivas del oxígeno (ROS) de los macrófagos. Una vez adheridos, penetran al citoplasma del macrófago, probablemente como resultado de la fagocitosis o por invasión activa, quedando dentro de una vacuola parasitófora de donde el macrófago intenta eliminarlo por medio de la secreción de ROS, óxido nítrico (NO), lisozimas e hidrolasas lisosomales. Una vez dentro, los promastigotes de *Leishmania* tienen la capacidad de evadir la respuesta inespecífica del macrófago, se transforman en amastigotes y se multiplican hasta provocar su estallido, liberando los amastigotes al espacio intercelular para invadir nuevas células del sistema fagocítico mononuclear (Lainson & Shaw 1987; Alvar-Ezquerria 2001; Vannier-Santos et al. 2002; Jamjoom et al. 2004).

Durante el proceso de diferenciación del promastigote en amastigotes, se retarda la formación del fagosoma-lisosoma por la reducción en la expresión de marcadores rab7 y LAMP1 (Sibley 2011). Por otra parte el promastigote libre en el tejido cutáneo también interacciona con los neutrófilos, quienes activados por la lesión, acuden para fagocitar aproximadamente al 80% de los promastigotes, los cuales a su vez son fagocitados por los macrófagos actuando como un “caballo de troya”. Además, un 5% de los promastigotes interaccionan directamente con las células dendríticas (Peters & Sacks 2009) que van a redirigir la respuesta inmunológica, inicialmente hacia la producción de IL-12.

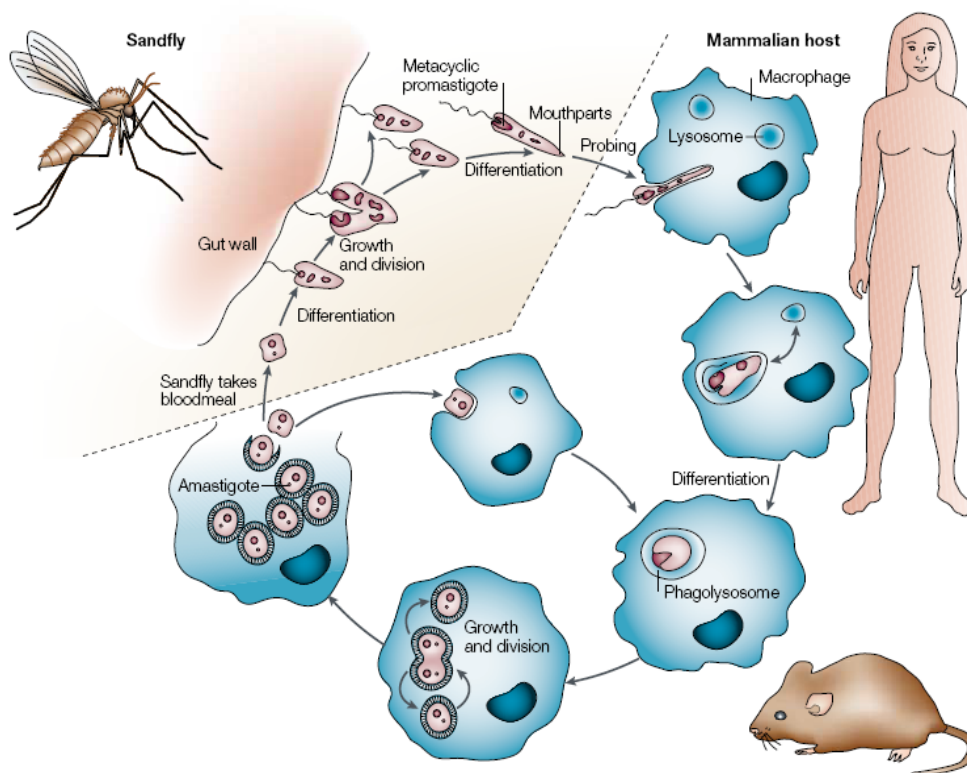


Fig. 4. Ciclo biológico de *Leishmania*. Adaptado de (Sacks & Noben-Trauth 2002).

ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Leishmania es un protozoo que tiene un genoma haploide. El núcleo contiene el ADN nuclear (ADNn) que se encarga de la replicación del parásito. Presenta, además, una mitocondria modificada, que recibe el nombre de kinetoplasto (ADNk) (Rogers & Wirth 1987).

Los cromosomas varían en tamaño y composición de acuerdo a cada especie. En las especies circulantes en el viejo mundo se ha identificado 36 cromosomas en los complejos *L. donovani* y *L. major*. En cambio en las especies del nuevo mundo varían desde 34 en el complejo *L. (L.) mexicana* (los cromosomas 8 + 29 y 20 + 36 están fusionados) y 35 en el complejo *L. (V.) braziliensis* (los cromosomas 20 + 34 están fusionados) (Wincker et al. 1996; Ivens et al. 2005).

El genoma de *Leishmania* es rico en contenido de G+C (57–60%) y mayor en relación a otros Trypanosomatidos, las regiones codificantes (ORF) son aún más ricos en contenido de G+C (58-62%) (Peacock et al. 2007). Los genes que codifican proteínas carecen de intrones y se organizan en cadenas repetitivas o en tándem, estando separados entre sí por cadenas cortas de ADN denominadas espaciadores intergénicos. La mayoría de estos genes poseen varias copias y con secuencias altamente conservadas, mientras que otras solamente poseen una copia única en todo el genoma. También se ha descrito que las regiones no codificantes pueden ser altamente divergentes (Ivens et al. 1998).

La secuenciación del genoma de *L. major* fue concluida en 2005 (Ivens et al. 2005), los de *L. infantum* y *L. braziliensis* en 2007 (Peacock et al. 2007), los de *L. donovani* y *L. mexicana* en 2011 (Downing et al. 2011; Rogers et al. 2011), el de *L. tarentolae* en 2012 (Raymond et al. 2012), y el genoma de *L. amazonensis* se ha concluido recientemente y aún está sujeto a revisión (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/Leishmania>). En la Tabla 1 presentamos un resumen de las características del genoma de las diferentes especies secuenciadas (Real et al. 2013).

El ADNk representa entre el 10 y 20% del genoma del parásito, es una estructura compleja altamente organizada constituida por 10^7 pares de bases, donde se pueden distinguir dos tipos de moléculas de ADN circular concatenadas entre sí, los minicírculos y los maxicírculos (Bañuls et al. 2002; Bañuls et al. 2007).

Los **minicírculos** son los componentes mayoritarios del ADNk y están constituidos por cadenas circulares de 5.000 a 50.000 repeticiones. Su tamaño varía de 0.7 a 1.0 kb, dependiendo de la especie de *Leishmania*. Codifican pequeñas unidades de ARN que son ricos en uridina, son secuencias altamente variables y son conocidos como ARN guías (ARNg) (Shapiro et al. 1999; Lukes et al. 2002; Nocua et al. 2011).

Tabla 1. Resumen de las características del genoma de *Leishmania* spp.

	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) major</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) donovani</i>	<i>L. (L.) tarentolae</i>
Cromosomas	35	34	34**	36	36	36	36
Tamaño (Mb)	33,7	32,1	29,6	32,8	32,1	32,4	30,4
Número de genes	8153	8007	8100	8298	8216	8252	8201
<i>Contigs</i>	1041	35	3199	36	37	2154	N/A
Contenido G+C (%)	57,8	60,5	58,5	59,7	59,3	>60	57,2
Densidad de Genes (gen/Mb)	228	256	273	260	252	254	270
Contenido G+C codificantes (%)	60,38	61,23	61	62,5	62,45	61	58,4
Autores	(Peacock et al. 2007)	(Rogers et al. 2011)*	(Real et al. 2013)**	(Ivens et al. 2005)	(Peacock et al. 2007)	(Downing et al. 2011)	(Raymond et al. 2012)

L. (L.) mexicana* está en proceso de confirmación; *L. (L.) amazonensis* está en revisión y el número de cromosomas todavía no está definido completamente.

Los **maxicírculos** son análogos estructurales al ADN mitocondrial de otros eucariotas. Están constituidos de 20 a 50 copias y su tamaño varía de 20 a 38 kb. A excepción de la región divergente, son moléculas altamente conservadas y se caracterizan por tener elementos repetitivos en su secuencia. Los maxicírculos contienen ARNr y/o ARNg. Codifican para 18 genes estructurales, entre los que se encuentran las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial como el citocromo b (cit-b), las subunidades de la citocromo C oxidasa (COI, COII, COIII) y las subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND1, ND3, ND4, ND7, ND8 y ND9), incluyendo las proteínas ribosomales S12 (RPS12), 12S, 9S y RSP12, además de cuatro ORF conocidos como MURF1, MURF2, MURF4 o ATPasa 6 (Bhat et al. 1990) y MURF5 (Shapiro et al. 1999; Lukes et al. 2002; Yatawara et al. 2008; Nocua et al. 2011).

TAXONOMÍA

En 1903, Sir Ronald Ross, Profesor de Medicina Tropical de la Universidad de Liverpool, asigna el nombre genérico de *Leishmania* a estos parásitos en homenaje a W. B. Leishman (Ross 1903). En 1916, se determinó la disposición taxonómica de *Leishmania* en base a características extrínsecas como: la ecobiología, ubicación geográfica, manifestaciones clínicas, vectores, cultivo *in vitro*, y reservorios (Lainson & Shaw 1987). Posteriormente se añadió su localización en el tracto digestivo del vector (Lainson et al. 1979). Actualmente, la taxonomía se basa en el análisis isoenzimático (zimodemas) (Gardener 1977; Thomaz-Soccol et al. 1993) y del genoma, utilizando especialmente métodos que se basan en la secuenciación molecular del ARN ribosomal (Cavalier-Smith 1998).

Leishmania se encuadra dentro del imperio **EUKARIOTA** (Cavalier-Smith 1998), reino **PROTOZOA** (Stechmann & Cavalier-Smith 2002; Cavalier-Smith & Chao 2003), subreino **BICILIATA** (Cavalier-Smith & Chao 2003), Infra-reino **EXCAVATA** (Cavalier-Smith 2002), *Superphylum* **DISCICRISTATA** (Cavalier-Smith 1993), *phylum* **EUGLENOZOA** (Cavalier-Smith 1978), *subphylum* **SACCOSTOMA** (Cavalier-Smith 1998), clase **KINETOPLASTEA** (Vickerman 1976), subclase **METAKINETOPLASTINA** (Moreira et al. 2004), orden **TRYPANOSOMATINA** (Kent 1880; Hollande 1952), familia **Trypanosomatidae** (Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905), género **Leishmania** (Ross 1903), subgéneros **L. (*Leishmania*)** (Ross 1903) y **L. (*Viannia*)** (Lainson & Shaw 1987), complejos **L. donovani**, **L. tropica**, **L. major**, **L. aethiopica**, **L. mexicana**, **L. braziliensis**, **L. panamensis**, **L. naiffi** y **L. lainsoni** (Lainson & Shaw 1972; WHO 1990; Bañuls et al. 2007). La relación de todas las especies se presenta en la Fig. 5. Se conocen más de 70 especies de *Leishmania*, de los cuales 30 se han encontrado en mamíferos y más de 20 son patógenas para el hombre (Lainson & Shaw 1987; Richards & Cavalier-Smith 2005; Bañuls et al. 2007).

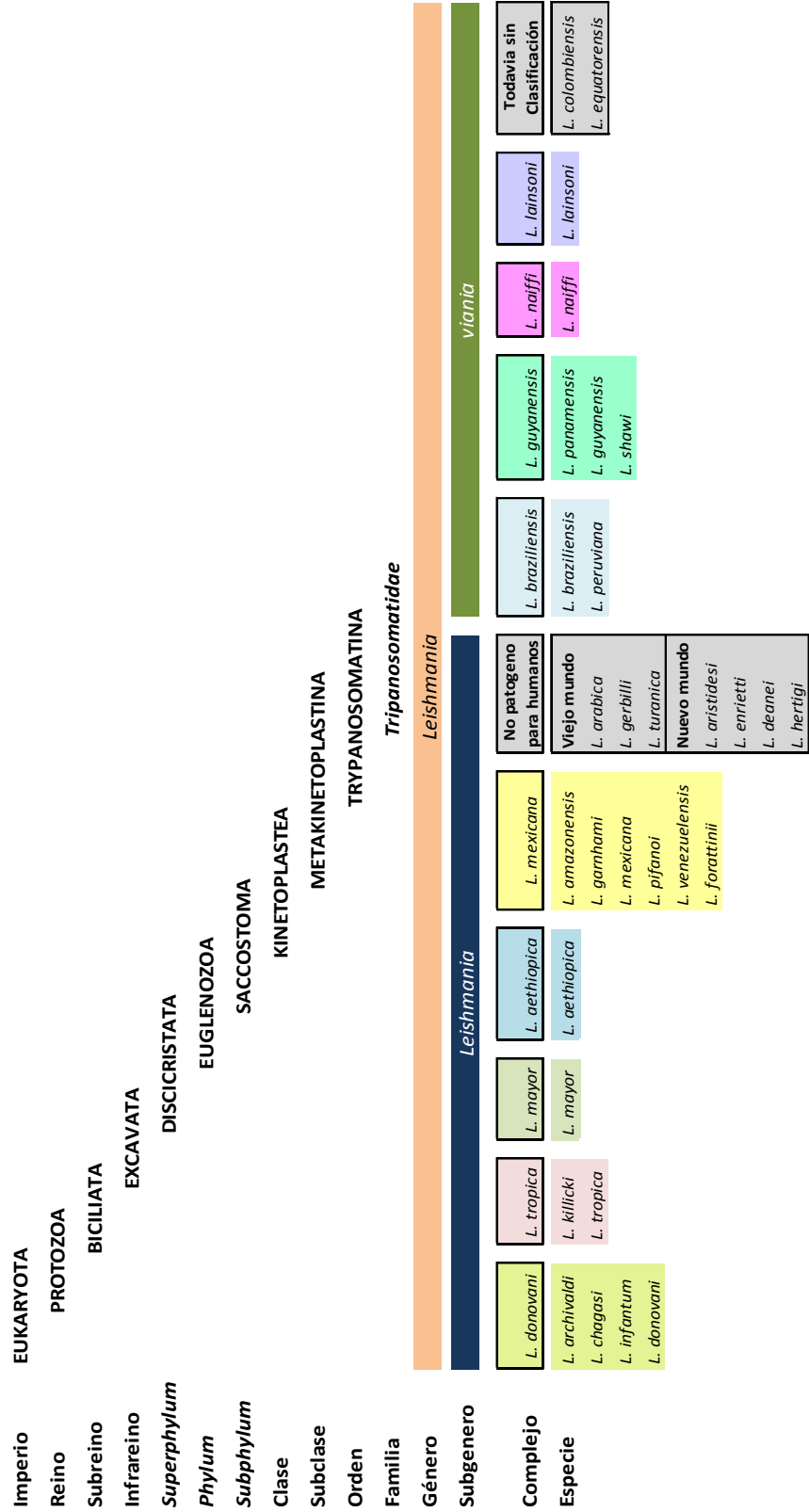


Fig. 5. Clasificación Taxonómica, basada en Cavalier-Smith, Honigberg, Vickerman, Kent, Doflein y Ross. Adaptado y modificado (WHO 1990; Bañuls et al. 2007).

CARACTERIZACIÓN DE *LEISHMANIA*

Tradicionalmente, las leishmaniosis se clasificaron según las manifestaciones clínicas observadas en los pacientes, dada la similitud morfológica entre las diferentes especies. Posteriormente se emplearon métodos basados en caracteres fenotípicos, sin embargo, la incorporación de diversas técnicas moleculares, ha permitido el análisis del genoma del parásito, siendo herramientas especialmente útiles en la caracterización taxonómica y filogenética de una gran variedad de especies.

TÉCNICAS FENOTÍPICAS DE CARACTERIZACIÓN

En 1973 Milkman introduce por primera vez el análisis isoenzimático para la identificación de una extensa variedad de cepas de *Escherichia coli* (Milkman 1973). Posteriormente, esta técnica se aplicó sobre numerosos organismos incluidos los parásitos. Los isoenzimas son enzimas con la misma función pero que presentan algún cambio en un aminoácido, lo que les confiere diferente movilidad cuando se someten a un campo eléctrico. Se ha acuñado el término “zimodema” para hacer referencia a las poblaciones de parásitos de una misma especie que poseen los mismos perfiles enzimáticos (Lumsden 1977). Se puede obtener una importante información taxonómica del análisis de las bandas electroforéticas, las cuales van a variar según los diferentes alelos o las frecuencias genotípicas de los loci que están presentes en distintos aislados de parásitos (Avisé 1974). De hecho, las técnicas isoenzimáticas han sido las técnicas de caracterización fenotípica más ampliamente utilizadas en *Leishmania*, y aún se considera a la “*Multilocus enzyme electrophoresis*” (MLEE) como la técnica “*gold standar*” para la identificación de las especies y estudios poblacionales (Rioux et al. 1990; Stackebrandt & Goebel 1994; Almeida & Araujo 2013).

Actualmente se ha visto que esta técnica presenta muchas limitaciones, debido a que los diferentes perfiles observados en la electroforesis pueden deberse

simplemente al heterocigotismo de un simple nucleótido (Jamjoom et al. 2004), por otro lado pierde resolución a la hora de identificar variaciones en la diversidad nucleotídica de un gen en particular (Mauricio et al. 2006; Zemanová et al. 2007) y es insuficiente para discriminar genotipos distintos pero con fenotipos indistinguibles (Mauricio et al. 2006; Alam et al. 2009).

TÉCNICAS GENOTÍPICAS DE CARACTERIZACIÓN

Alternativamente se han diseñado múltiples técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes PCR-multiplex, PCR-RFLP o PCR-RAPD, además de la secuenciación parcial de regiones conservadas del ADN nuclear o mitocondrial que permiten la caracterización molecular con un alto nivel de confianza (Schönian et al. 2011; Almeida & Araujo 2013).

Los marcadores moleculares utilizados son los cariotipos y regiones del ADNn, ADNk y ARNr. A nivel del ARNr se han descrito marcadores moleculares de las regiones no codificantes (ITS1 e ITS2), el miniexon, la SSU-ARNr y 7SL-ARN. También se han descrito los genes de estructuras proteicas (proteínas de shock térmico y subunidades de la cadena respiratoria en la mitocondria), lípidos, enzimas que participan en el metabolismo de los carbohidratos G6PD y moléculas de superficie (glicoproteína-63) (Shaw 1994; Schönian et al. 2011).

En la última década se ha incorporado una nueva herramienta con significativa utilidad en el estudio de la taxonomía, filogenia y genética de poblaciones de *Leishmania*. La tipificación de secuencias multilocus (*multilocus sequence typing* = MLST), que se basa en la secuenciación nucleotídica de los genes que codifican las enzimas utilizadas en la MLEE.

Para la identificación del complejo *L. donovani* se han descrito 5 marcadores que incluyen: glutamato-oxaloacetato transaminasas 1 (GOT1) o aspartato-aminotransferasa (ASAT), glucosa-6-fosfato-isomerasa (GPI), nucleosido-fosforilasa-1 (NH1), nucleosido-fosforilasa-2 (NH2) y 6-fosfogluconato-

dehidrogenasa (PGD) (Mauricio et al. 2006). En cambio para la caracterización del subgénero *L. (Viannia)* solamente se ha utilizado 4 marcadores que incluyen: Manosa-fostato-isomerasa (MPI), Malato deshidrogenasa (MDH), Glucosa-6-fosfato-isomerasa (GPI) y 6-Fosfogluconato-dehidrogenasa (PGD) (Tsukayama et al. 2009; Boite et al. 2012).

En 2007 se ha introducido una nueva herramienta para la tipificación de los microsatélites en multilocus (*multilocus microsatellite typing* = MLMT), que actualmente se está aplicando al estudio de la diversidad de las especies viscerales en el viejo mundo. La resolución de esta técnica permite la diferenciación de cepas de una misma especie e identifica 14 marcadores de los microsatélites: Li41-56 B, Li46-67 C, Li22-35 E, Li23-41 F, Li45-24 G, Li71-33 P, Li71-5/2 Q, Li71-7 R, Lm2TG, TubCA, Lm4TA, CS19, CS20, LIST7031 y LIST7039 (Kuhls et al. 2007).

ANÁLISIS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En la literatura se pueden encontrar muchos marcadores para la identificación de *Leishmania* mediante PCR. Algunos de estos estudios proponen diferentes dianas moleculares a nivel del ADN nuclear, ADNk y ADN microsatélite. Entre los más utilizados, está la amplificación del gen de la subunidad menor del ARN ribosomal (SSU-rRNA) (van Eys et al. 1992), secuencias repetitivas del genoma (Piarroux et al. 1995), las unidades repetitivas del miniexon (Marfurt et al. 2003a), la región relativamente conservada de la β -tubulina (Luis et al. 1998), la región que codifica la glicoproteína de membrana gp63, (Victoir et al. 1998), la región no codificante de los espaciadores internos de transcripción (ITS1 e ITS2) (el Tai et al. 2000; Khanra et al. 2012), la cistein-proteinasa b (Victoir et al. 1998), las unidades repetitivas en *tandem* del ADN en microsatélites (Russell et al. 1999) y marcadores del ADNk a nivel de los minicírculos y maxicírculos (Rodgers et al. 1990; de Bruijn & Barker 1992; Aviles et al. 1999; Bensoussan et al. 2006).

ANÁLISIS MEDIANTE PCR-RFLP

Los productos de PCR pueden ser analizados en base al polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP). Para ello existen numerosas endonucleasas que pueden unirse y escindir en diferentes sitios de una secuencia de ADN previamente amplificada con posterior análisis electroforético de los fragmentos de restricción. (Schönian et al. 2011; Almeida & Araujo 2013).

Para la identificación de *Leishmania*, se han diseñado técnicas basadas en la PCR-RFLP utilizando diferentes marcadores moleculares. Entre las técnicas descritas, se encuentran marcadores de regiones específicas del ADNk que permiten diferenciar entre las especies de *L. braziliensis* y *L. amazonensis* mediante la PCR-RFLP (*Hae*-III) (Volpini et al. 2004). Una región específica de la gp63 permite diferenciar complejos y especies del viejo y nuevo mundo mediante la PCR-RFLP *Hae*-III, *Bgl*-I, *EcoR*-I y *Sal*-I (Victoir et al. 1998). Las secuencias de empalme del minixon (SLME) digeridas con la enzima *Eae*-I permite diferenciar las especies del complejo *L. (Viannia)* y la digestión *Hae*-III, *Nco*-I y *Rsa*-I permiten diferenciar especies del subgénero *L. (Leishmania)* (Marfurt et al. 2003b). Los espacios intergénicos e intragénicos de la cisteinproteínasa-b (cpb), digerida con la enzima de restricción *Hae*-III, permite diferenciar los complejos *L. donovani*, *L. major* y *L. aethiopica* (Tintaya et al. 2004). La secuencia de la SSU-rARN, digerida con las enzimas de restricción *Taq*-I, *Hae*-III, *Dde*-I, *Pst*-I, *Hpa*-II, *Rsa*-I y *Bfa*-I, es capaz de diferenciar *L. (V.) braziliensis* de *L. (V.) guyanensis* (Rotureau et al. 2006). Los amplicones de la ITS1 y ITS2, digerida con la enzima de restricción *Hae*-III, permite diferenciar especies tanto del nuevo mundo como del viejo mundo (Schönian et al. 2003). Una región parcial del gen de la HP70, digerida con la enzima *Hae*-III, permite identificar los complejos *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y las especies *L. (V.) lainsoni* y *L. (Leishmania) chagasi/infantum* del nuevo mundo (García et al. 2004).

ANÁLISIS MEDIANTE PCR-RAPD

El método RAPD (del inglés *Random amplified polymorphic DNA*) es un sistema de amplificación al azar de polimorfismos en la secuencia de ADN. (Schönian et al. 2011).

Ha sido utilizado con éxito para la identificación de especies de *Leishmania* del nuevo mundo (Ishikawa et al. 2002). Por ejemplo, ha permitido determinar que *L. infantum* y *L. chagasi* pertenecen a un mismo grupo taxonómico (Mauricio et al. 1999). También ha permitido identificar la presencia de polimorfismos intraespecíficos en *L. (V.) braziliensis* (Gomes et al. 1995).

MARCADORES MOLECULARES SELECCIONADOS

ESPACIADORES INTERNOS DE TRANSCRIPCION (ITS)

Los espaciadores internos de transcripción de los genes ARNr, son regiones no codificantes del ADN, estas regiones son los precursores policistrónicos de la transcripción de los genes ARNr SSU rRNA, 5.8S rRNA y LSU rRNA (el Tai et al. 2000).

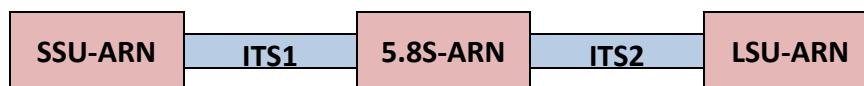


Fig. 6. Representación esquemática de los espaciadores internos de transcripción (el Tai et al. 2000).

En *Leishmania* los genes del ARNr están dispuestos en tándem al igual que en otros protozoos (Fig. 6). Las regiones codificantes tienen un tamaño de ~8Kb y ~160 copias del gen. Se distinguen 2 espaciadores internos de la transcripción (ITS1 e ITS2), con una tasa de evolución muy alta, lo que los convierte en excelentes marcadores moleculares para la diferenciación de especies y su aplicación a la taxonomía y filogenia. Las especies que se han estudiado son *L. donovani*, *L. infantum*/*L. chagasi*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*,

L. amazonensis, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (el Tai et al. 2000; Schönan et al. 2003; Kuhls et al. 2005).

PROTEINAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP70)

La familia de las proteínas de choque térmico (HSP) juega un papel fundamental para garantizar la adaptación a los cambios de temperatura entre el vector y el hospedador vertebrado.

Dentro de esta familia están las HSP70, son proteínas altamente conservadas a nivel molecular y funcional. Participan en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, la unión a proteínas para evitar la formación de agregados, la translocación de proteínas a través de membrana, la degradación de proteínas inestables y el control de la actividad de otras proteínas reguladoras (Folgueira & Requena 2007; Ramírez et al. 2011). Las HSP70 se localizan en una amplia variedad de compartimentos celulares como el citoplasma, el retículo endoplasmático y las mitocondrias (Mayer & Bukau 2005). La proteína HSP70 representa un 2,1% de la proteína total celular de las especies (Brandau et al. 1995). El número de genes que codifican la HSP70 en *L. donovani*, *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis* son 12-15, 5, 6, 7 y 8 respectivamente, están organizados en tándem y se localizan en diferentes locus dentro de un mismo cromosoma (Folgueira & Requena 2007; Ramírez et al. 2011).

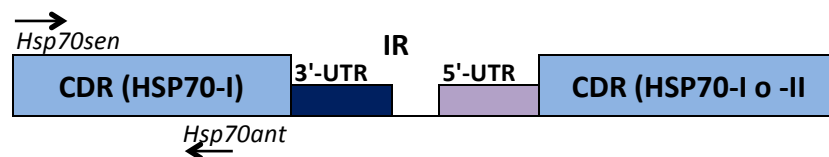


Fig. 7. Representación esquemática del locus HSP70 de *Leishmania* (fragmento), que muestra la región amplificada en este estudio. Las flechas indican el sitio de unión del cebador, CDR (regiones codificantes de proteínas); UTR (regiones no transcritas; IR (región intergénica). Adaptado (Requena et al. 2012).

Los genes HSP70 han sido extensamente utilizados para la identificación de especies mediante PCR-RFLP y combinada con secuenciación nucleotídica para la identificación de especies y estudios filogenéticos y taxonómicos

respectivamente (García et al. 2004; Fraga et al. 2010; Montalvo et al. 2010). Recientemente se ha propuesto que la secuenciación de la región no codificante 3'-UTR del gen HSP70-I permitiría obtener la identificación de gran parte de las especies del género *Leishmania* (Fig. 7) (Requena et al. 2012).

Otro marcador de la familia HSP, es la región del gen de la HSP20. Esta proteína está involucrada en el plegamiento, ensamblaje, localización intracelular, secreción, regulación, estabilización y degradación de proteínas (Folgueira & Requena 2007). Tanto sus secuencias como sus funciones son altamente conservadas y la única HSP pequeña encontrada en *Leishmania* y otros Trypanosomatidos. La secuenciación de este gen demuestra que es una herramienta muy útil y práctica para la identificación y los estudios filogenéticos en *Leishmania*. El tamaño aproximado de 370 pb, supone una ventaja para el diagnóstico e identificación, entre las técnicas de secuenciación, en comparación con otros marcadores de gran tamaño como la HSP70, con un tamaño de 1380 pb (Fraga et al. 2013).

CITOCROMO B (*cit-b*)

Es la subunidad menor de la coenzima-Q que participa en el sistema de transporte de electrones en la mitocondria. Tiene la capacidad de oxidación y reducción durante el transporte de oxígeno y electrones hacia las moléculas orgánicas para la síntesis de ATP y otros procesos celulares. El citocromo b junto al citocromo C₁, se encuentran en la mitocondria de todos los organismos eucariotas como subunidades de la proteína ubiquinol-citocromo C reductasa, también llamada citocromo bc₁ o Complejo III de la cadena respiratoria (Glew et al. 1988; Esposti et al. 1993).

En *L. tarentolae*, la secuencia completa del gen del cit-b (Fig. 8), tiene un tamaño de 1079 pb y consta de 2 regiones: la región editada 5' de 23 pb y la región no editada 3' de 1056 pb. Los procesos de inserción y delección de residuos de Uridina (U) en la edición del ARN del ADNk, permiten reparar los

desplazamientos en las secuencias genómicas y crear los codones de iniciación AUG en *Leishmania spp.* y UUA en *L. major*. La transcripción del cit-b, presenta 39 inserciones de residuos de U en 15 sitios de la región editada. Consecuentemente se han creado un total de 20 codones, incluyendo AUG (Met), para iniciar la inserción de un residuo de U entre las posiciones 2 y 3 de la región editada. También, el codón ATT (Leu) se convierte en el primer aminoácido en la región no editada.

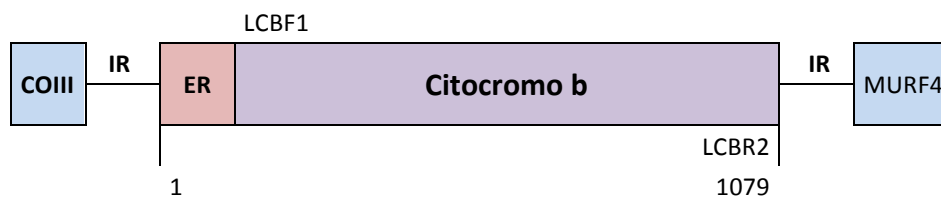


Fig. 8. Representación esquemática del gen del cit-b en los maxicírculos del ADNk de *Leishmania*; COIII (citocromo c oxidasa subunidad III); MURF4 (marco de lectura 4 no identificado) ; ER (región de edición); IR (región intergénica) (Luyo-Acero et al. 2004).

Diversos estudios han comparado los resultados de la secuenciación del gen del cit-b y el análisis isoenzimático (MLEE) en la caracterización de especies de *Leishmania*, demostrando total concordancia entre ambas herramientas. La conclusión de estos antecedentes validan la secuenciación del gen del cit-b como una herramienta útil para la caracterización de especies de *Leishmania* (Luyo-Acero et al. 2004; Marco et al. 2006; Foulet et al. 2007). Recientemente, se ha establecido que la secuenciación de este gen es un herramienta útil, no solo para la identificación de especies, sino también, para estudios filogenéticos y de poblacionales (Asato et al. 2009; Yang et al. 2013a).

TRANSMISIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad de transmisión vectorial y los insectos involucrados son dípteros de la subfamilia *Phlebotominae*. Se han descrito más de 900 especies, de los cuales, cerca de 70 se consideran posibles vectores, sin embargo solamente 30 especies de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* tienen

relevancia clínica (Harwood et al. 1979; Molyneux & Killick-Kendrick 1987; Desjeux 1996; Killick-Kendrick 1999; Bañuls et al. 2007; Ready 2013).

En América se han descrito más de 47 especies de *Lutzomyia*, de los cuales 36 especies son vectores del subgénero *Leishmania* (*Viannia*) y 10 del subgénero *Leishmania* (*Leishmania*) (Tabla 2). Solamente una especie, *Lutzomyia ayacuchensis*, ha sido descrita como vector de ambos subgéneros y su hábitat se localiza entre las regiones de Ecuador y Perú (Ready 2013).

En las zonas tropicales y subtropicales de Los Andes de Bolivia se han citado las siguientes especies circulantes: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* y *L. chagasi*. (García et al. 2007b; García et al. 2009; Alvar et al. 2012), estando implicadas las especies *Lutzomyia nuneztovarianglesi*, *Lu. carreraicarrerae*, *Lu. llanosmartinsi*, *Lu. shawi*, *Lu. ayrozai*, *Lu. yucumensis* como vectores del subgénero *Leishmania* (*Viannia*), y *Lu. nuneztovarianglesi*; y *Lu. flaviscutellata* y *Lu. longipalpis* como vectores del subgénero *Leishmania* (*Leishmania*) (García et al. 2009; Alvar et al. 2012).

Se han identificado tres ciclos epidemiológicos en *Leishmania*: ciclo selvático zoonótico, ciclo rural o peridoméstico y ciclo urbano. En muchos focos de enfermedad la leishmaniosis es una zoonosis, y la «intrusión» del ser humano en los ciclos selváticos tiene como resultado un aumento del riesgo de infección. Los ciclos peridomésticos se presentan como grandes brotes en pueblos marginales donde el reservorio co-existe con el hospedador. En el ciclo urbano, las especies implicadas son *L. donovani* que es estrictamente antroponótica, y *L. infantum*, cuyos reservorios principales son los perros y roedores (Cruz et al. 2013; Ready 2013).

Tabla 2. Distribución de las poblaciones parasitarias y vectoriales según la región y su ciclo de transmisión en América (Ready 2013).

Especie	PARÁSITO			VECTOR	
	Regiones endémicas*	Ciclo epidemiológico	Reservorio principal	Vector identificado	Posibles vectores
<i>L. infantum</i>	Latinoamérica menos Perú y Guyana	Urbanas y periurbanas	Perros	<i>Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis</i> s.l.	<i>Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi</i> <i>L. (L.) cruzi</i> <i>L. (Pifanomyia) evansi</i>
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	Este de Los Andes, menos Guyana y Surinam	Rural y Selvático	Roedores, marsupiales y perros	<i>L. (Psychodopygus) wellcomei</i> <i>L. (Nyssomyia) neivai</i> <i>L. (Ny.) whitmani</i>	<i>L. (Nyssomyia) intermedia</i> <i>L. (Migonei) migonei</i> s.l. <i>L. (Psychodopygus) carrerai</i>
	Oeste de Los Andes, Norte de Venezuela, menos El Salvador	Rural y Selvático	Roedores, marsupiales y perros	<i>L. (Pifanomyia) ovallesi</i>	<i>L. (Pf.) townsendi</i> s.l. <i>L. (Helcocyrtomyia) pescei</i> s.l. <i>L. (Ps.) panamensis</i>
<i>L. (V.) peruviana</i>	Perú	Rural y Selvático	Roedores, marsupiales y perros	No identificado	<i>L. (He.) peruensis</i> s.l. <i>L. (Pf.) verrucarum</i> s.l.
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Este de Los Andes, menos Paraguay	Selvático	Desdentados arbóreos y otros	<i>L. (Ny.) umbratilis</i>	<i>L. (Ny.) anduzei</i> <i>L. (Ny.) shawi</i> <i>L. (Ny.) whitmani</i>
<i>L. (V.) panamensis</i>	Oeste de Los Andes, Venezuela, menos en Belice, México y El Salvador	Selvático	Desdentados arbóreos y otros	No identificado	<i>L. (Ny.) trapidoi</i> <i>L. (Ny.) ylephiletor</i> <i>L. (Ny.) edentula</i> <i>L. (Tricholateralis) gomezi</i>
<i>L. (V.) shawi</i>	Brasil	Selvático	Perezoso	No identificado	<i>L. (Ny.) whitmani</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Bolivia, Perú, Brasil, Guyana francesa, Surinam	Selvático	Roedores: <i>Agouti paca</i>	No identificado	<i>L. (Trichophoromyia) ubiquitalis</i> <i>L. (Pf.) nuneztovari</i>
<i>L. (V.) colombiensis</i>	Panamá, Colombia y Venezuela	Selvático	Perezoso	No identificado	<i>L. (He.) hartmanni</i>
<i>L. (V.) naiffi</i>	Brasil, Panamá y Guyana Francesa	Selvático	Armadillo	No identificado	<i>L. (Ps.) ayrozai</i> <i>L. (Ny.) trapidoi</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Este de Los Andes, menos Guyana, Paraguay	Selvático	Roedores y marsupiales	<i>L. (Ny.) flaviscutellata</i>	<i>L. (Ny.) olmeca nociva</i> <i>L. (Ny.) olmeca reducta</i> <i>L. (L.) longipalpis</i>
<i>L. (L.) mexicana</i>	Oeste de Los Andes, Sudeste de EE. UU. menos Perú	Selvático	Roedores y marsupiales	<i>L. (Ny.) olmeca olmeca</i>	<i>L. (Ny.) olmeca bicolor</i> <i>L. (Dampfomyia) anthophora</i> <i>L. (Tricholateralis) diabolica</i>
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Norte de Venezuela	Selvático	No identificado	No identificado	<i>L. (Ny.) olmeca bicolor</i>

*Uruguay y Chile se consideran libres de leishmaniosis

Dependiendo de la región, se han descrito diferentes reservorios del parásito, existiendo uno principal y otros accidentales (WHO 2010a), de tipo doméstico o selvático sin que necesariamente presenten evidencia clínica (Killick-Kendrick 1999).

FORMAS CLÍNICAS

Las especies del género *Leishmania* causan un complejo grupo de enfermedades conocidas como leishmaniosis. Clínicamente se manifiestan de diversas formas (viscerales, cutáneas, cutánea difusa y mucocutáneas), los que parecen asociarse a factores genéticos, al vector de transmisión, la localización en el hospedador y la respuesta inmunológica del propio hospedador (WHO 2010a).

Leishmaniosis visceral (LV). Es la forma más grave de la enfermedad (Fig. 9 y 10). Las especies del complejo *L. (L.) donovani* (*L. donovani* y *L. infantum* (*L. chagasi* en el nuevo mundo)), son los agentes responsables de la LV. Aunque, se han descrito casos muy aislados de LV causados a la infección por *L. tropica* (Sacks et al. 1995), *L. mexicana* (Ramos-Santos et al. 2000) y *L. amazonensis* (Barral et al. 1986).



Fig. 9. LV en Bolivia (Mollinedo 2002).

En la India la LV es conocida como **Kala azar**, siendo el agente causal *L. donovani*. Afecta principalmente al hígado y bazo. Después de un periodo de latencia puede reaparecer a nivel dérmico, conociéndose a esta enfermedad como **Leishmaniosis dérmica Post Kala azar (LDPK)** (Killick-Kendrick 1999; Bañuls et al. 2007).



Fig. 10. LV del viejo mundo (Neuber 2008)

Afecta de forma generaliza al sistema mononuclear fagocítico, con episodios de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. La infección no tratada puede llegar a ser mortal y en ocasiones, tras

una recuperación, o aún de forma concomitante, puede desarrollarse leishmaniosis post-Kala-azar (forma cutánea crónica).

La LV y la LDPK también se ha asociado a complicaciones oculares, con hemorragia retinal, uveitis, keratitis, blefaroconjuntivitis (Khalil et al. 2011). Por otro lado en los últimos años se ha visto un creciente número de casos de co-infección leishmaniosis/VIH, con manifestaciones tales como pérdida de peso extrema, linfadenopatía, diarrea, esofagitis, esplenomegalia y lesiones cutáneas múltiples (Cook & Zumla 2008; Cohen et al. 2010).

La Leishmaniosis cutánea (LC), se caracteriza por presentar un nódulo localizado con una ligera inflamación y rubor que se desarrolla lentamente dando lugar a una lesión indurada o úlcera localizada. En términos generales las lesiones pueden ser de dos formas: ulcerativa o seca (Herwaldt 1999; Cook & Zumla 2008). La lesión ulcerativa es la forma más común y se asemeja a un volcán con los lados inclinados (Fig. 11). En el centro se encuentra una úlcera de profundidad variable y la secreción de coágulos cicatriza la



Fig. 11. Leishmaniosis cutánea (Mollinedo 2002).

lesión formando costras que la recubren. Esta úlcera se distingue por presentar un contorno ligeramente elevado, inflamado, rojizo, purpura o pálido. En la piel oscura la lesión puede ser escamosa y rodeada de pequeñas pápulas, a este tipo de lesión se la ha denominado lesión exudativa y se corresponde con la mayoría de las lesiones cutáneas provocadas por *L. major* (botón de oriente, forúnculo de aleppo, Biskra o Gafsa), *L. mexicana* (úlceras de los chicleros), *L. guyanensis* (pian bois), *L. peruviana* (Uta) y *L. braziliensis* (lesión cutánea) (Sangüeza & Cardenas 1980). La lesión seca, se presenta como una lesión nodular y papular. Se caracteriza por estar recubierto de una capa escamosa. Este tipo de lesión es debida a la infección por *L. tropica* (Cook 2007; Cook & Zumla 2008).

La diseminación linfática, también conocida como linfangitis. Se caracteriza por presentar nódulos que pueden ser únicos o en los casos más graves múltiples. Son lesiones unidireccionales que van drenando a los parásitos que rara vez se transforma en lesión secundaria (Fig.12). Este tipo de lesiones se presentan en las infecciones por *L. major*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (Cook & Zumla 2008).



Fig. 12. Diseminación linfática debida a *L. mayor*(Neuber 2008).

Leishmaniosis cutánea difusa (LCD), Este tipo de lesión es frecuente en pacientes con deficiencias en la respuesta inmune celular. Al inicio de la infección se observan nódulos no ulcerativos repletos de parásitos. Posteriormente estos nódulos se asocian y forman grandes parches que se difunden por todo el cuerpo (cara, tronco y extremidades). Su aspecto podría confundirse con la lepra lepromatosa. Es una de las manifestaciones clínicas más peligrosas desde el punto de vista de la resistencia a las terapias convencionales porque nunca llegan a curarse completamente. Esta patología se debe generalmente a la infección por *L. amazonensis* y *L. mexicana* y *L. aethiopica*. (Cook & Zumla 2008; WHO 2010a).

Leishmaniosis mucocutánea (LMC), también conocida como “espundia” en el nuevo mundo (Fig. 13), se caracteriza por la presencia de úlceras eritematosas en mucosas. Generalmente, se acompaña de un proceso inflamatorio con perforación y destrucción del tabique nasal. La mucosa bucal suele afectarse en la fase tardía de la infección. El parásito se propaga desde las fosas nasales hacia el paladar duro, el paladar blando, la úvula, la faringe e incluso las encías y el labio superior. Las formas graves pueden



Fig. 13. Leishmaniasis mucocutánea (Mollinedo 2002).

desfigurar completamente la cara y obstruir la laringe y/o faringe (Cook 2007; Cook & Zumla 2008). Los agentes etiológicos responsables son *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis* (Murray et al. 2005).

EPIDEMIOLOGÍA

La leishmaniosis es endémica en 98 países de regiones tropicales y subtropicales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) hay más de 12 millones de personas infectados con *Leishmania* y se estima que cada año se infectan otros 2.4 millones más, de los cuales 500.000 corresponden a la leishmaniosis visceral y 1.5 millones a la leishmaniosis cutánea (WHO 1990; Desjeux 2004; WHO 2008, 2010a). Se calcula que 350 millones de personas están en riesgo de contraer esta enfermedad que incapacita a más 1.8 millones personas y es la responsable de 70.000 muertes cada año (WHO 2010a).

Más del 90% de los casos de LV se concentran en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal y Sudán (Fig. 14D) (WHO 2010a; Kuhls et al. 2011; Alvar et al. 2012).

Dos tercios de la leishmaniosis visceral se debe a la transmisión antroponótica de *L. donovani*, distribuyéndose en el nordeste de India, sudeste de Nepal y centro de Bangladesh. El segundo mayor foco de leishmaniosis visceral se encuentra en Etiopía y Sudán (Fig. 14: D).

Leishmania infantum es uno de los agentes más importantes en la transmisión zoonótica de la enfermedad. Se distribuye a lo largo de la cuenca mediterránea, Oriente Medio, Asia Occidental y en Latinoamérica.

En el Viejo Mundo, la distribución de la leishmaniosis cutánea está definida en base a los ciclos de transmisión. *L. major* y *L. aethiopica* causan leishmaniosis cutánea zoonótica. *L. major* se distribuye principalmente en Afganistán, Arabia Saudí, Etiopía, India, Nigeria y Túnez. En cambio, *L. aethiopica* aparece en Etiopía y otros lugares de África Oriental. La leishmaniosis cutánea por *L. tropica* se produce en un ciclo predominantemente antroponótico, aunque se han

registrado casos aislados en animales domésticos. Es una enfermedad urbana y periurbana, apareciendo como grandes brotes en ciudades muy pobladas como Kabul, o Uagadugú (Fig. 14: B y C) (WHO 2010a).

En América, la epidemiología es compleja y presenta variaciones intraespecíficas e interespecíficas en los ciclos de transmisión, los reservorios, los vectores, las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento; además hay múltiples especies de *Leishmania* circulando en una misma zona geográfica. Todos los ciclos son predominantemente zoonóticos (WHO 2010a).

El 90% de la leishmaniosis mucocutánea se distribuye en Bolivia, Brasil y Perú y el 90% de los casos de leishmaniosis cutánea se distribuye en Bolivia, Brasil, Perú, Colombia, Venezuela, México y Panamá (Fig. 14: A) (Desjeux 1996, 2001, 2004; Alvar et al. 2012).

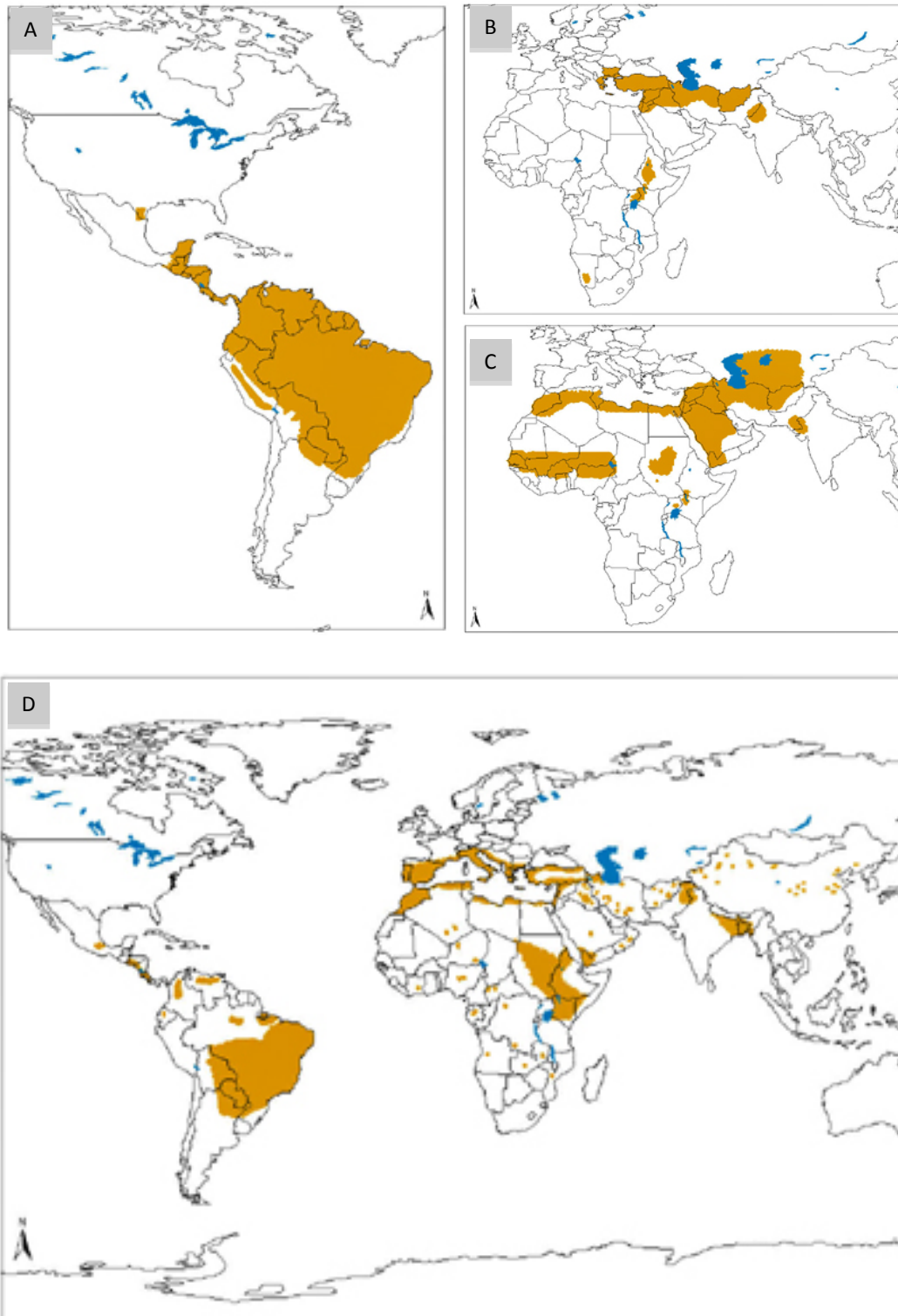


Fig. 14. Distribución global de la leishmaniosis: A) cutánea y mucocutánea en América; B) Leishmaniosis cutánea debida a *L. tropica* y *L. Aethiopica*; C) Leishmaniosis cutánea debida a *L. major*; D) Leishmaniosis visceral debida a *L. donovani* y *L. infantum* (http://www.who.int/leishmaniosis/leishmaniasis_maps/en/index.html).

En Bolivia, la leishmaniosis es endémica en 7 de los 9 Departamentos (Fig. 16). En los últimos 10 años se han notificado más de 27.695 casos y se estima que cerca de 800.000 personas están en riesgo de padecer esta enfermedad (Mollinedo et al. 2007; García et al. 2009). La región subandina del Departamento de La Paz es la más afectada y se considera el principal foco de infección con más del 50% de los casos registrados en todo el país (Fig. 15). Le siguen los Departamentos de Pando, Beni, Cochabamba, Santa-Cruz, Tarija y Chuquisaca.

La mayoría de los casos de leishmaniosis cutánea y mucocutánea se han atribuido a la infección por *L. braziliensis* y *L. amazonensis*, con menor frecuencia a la infección por *L. lainsoni* y casos aislados por *L. guyanensis* (Mollinedo et al. 2007; García et al. 2009). En cambio, durante el período 1983-2006, solo se registraron 10 casos de leishmaniosis visceral, todos ellos circunscritos a la región de los Yungas del Departamento de La Paz (Torrico et al. 2009). Entre los grupos más afectados se encuentran a los agricultores emigrantes o “colonos”, los jóvenes en edad de estudios y los niños menores de 5 años (fuente: Servicio Departamental de Salud de La Paz, Unidad de Epidemiología, Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia 2011).

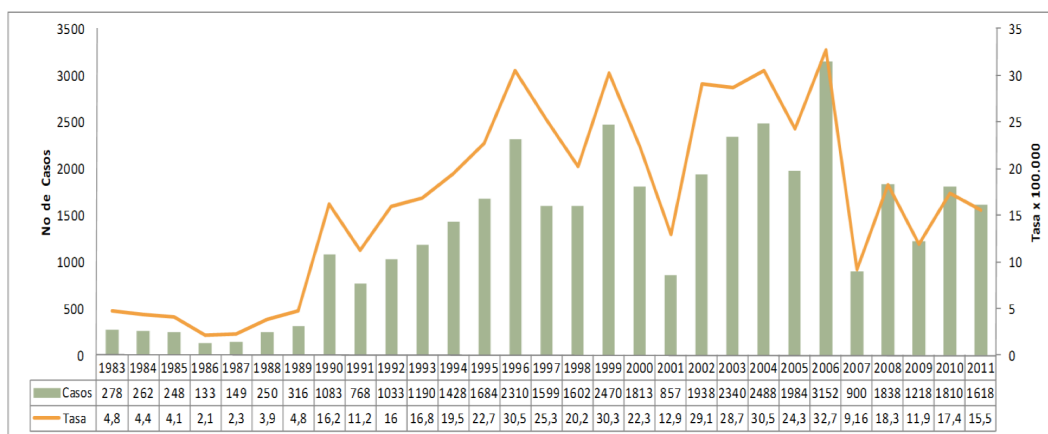


Fig. 15. Evolución de la Leishmaniosis en Bolivia (1983 – 2011); (Fuente: Programa Nacional de Leishmaniosis, 2011).

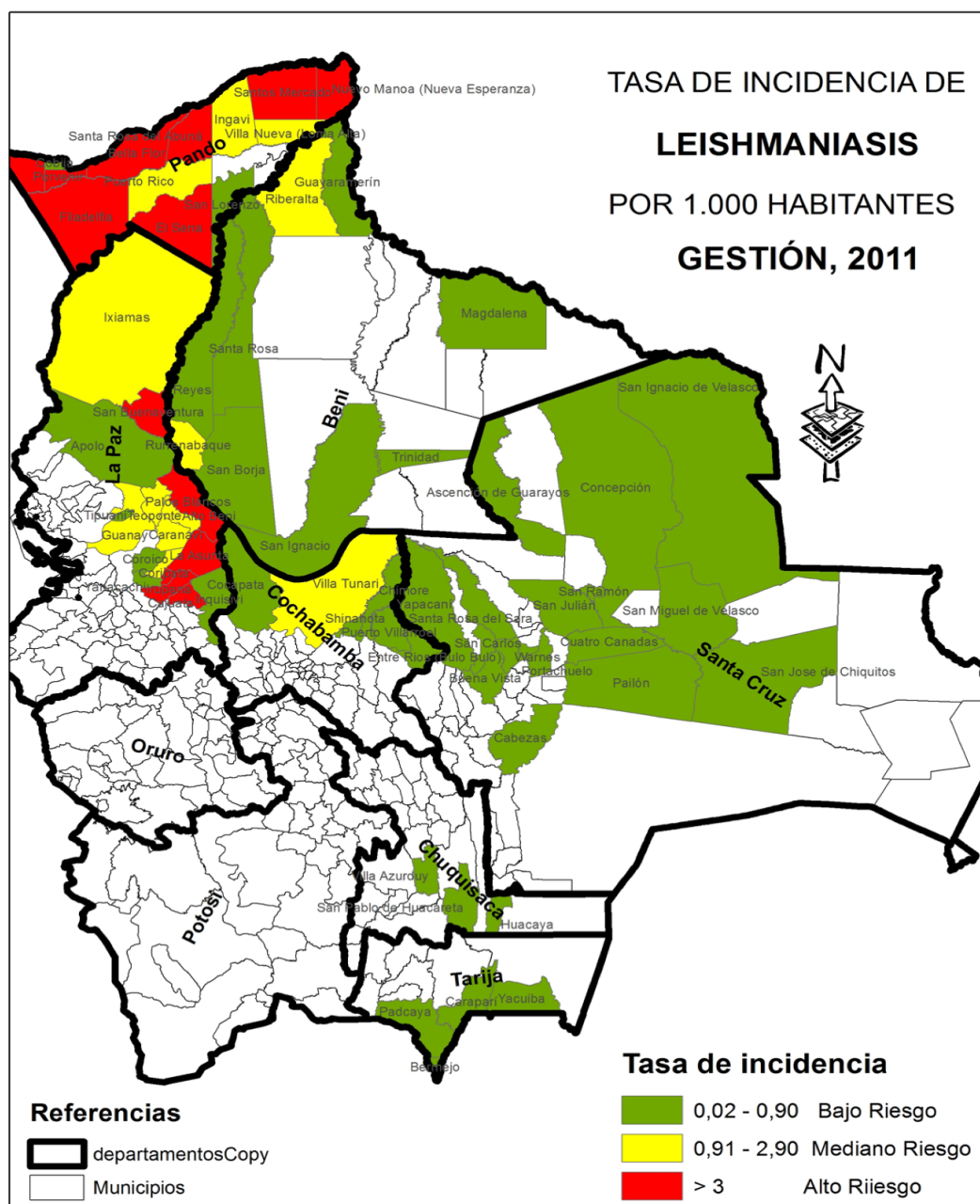


Fig. 16. Incidencia de la Leishmaniosis en el territorio Boliviano (Fuente: Programa Nacional de Leishmaniosis, 2011).

CONTROL FARMACOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD

TERAPÉUTICA CLÁSICA

Actualmente, las alternativas farmacológicas disponibles para el tratamiento de la leishmaniosis son insuficientes. El conjunto de fármacos existentes son limitados debido a su toxicidad, la aparición de resistencias y su escasa eficacia terapéutica. A todo ello debemos añadir los altos costes, terapias prolongadas y una infraestructura especializada para su administración parenteral, a menudo no disponible en zonas endémicas. A pesar de los continuos esfuerzos realizados por numerosos grupos de investigación en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, todavía no se cuenta con el fármaco ideal que permita erradicar esta enfermedad.

Por otro lado, debido a la aparición de resistencias, los expertos de la OMS, en los últimos años han formulado las siguientes recomendaciones:

- Los tratamientos disponibles solamente deberán de aplicarse después de la confirmación de la enfermedad.
- Los países endémicos deberán de generar una política nacional basada en combinaciones de fármacos que parece ser la mejor estrategia para evitar la aparición de resistencias (WHO 2010a).

Según la Organización Mundial de la Salud, los fármacos disponibles para combatir la enfermedad se pueden clasificar en antimoniales de *primera generación* y no antimoniales (WHO 2008).

Antimoniales.

El uso de los primeros antimoniales data de principios del siglo XX. Eran antimoniales trivalentes (Sb^{III}) que conseguían la curación de la enfermedad, sin embargo causaban severos problemas de nefrotoxicidad. En 1920 se empezaron

a utilizar los antimoniales pentavalentes (Sb^{V}), demostrando ser menos tóxicos que los Sb^{III} (Lainson 2010).

En la actualidad y después de casi 100 años, los fármacos de primera elección para el tratamiento de la leishmaniosis siguen siendo los derivados de Sb^{V} (Pentostan® y Glucantime®) (Fig. 17a y 17b, respectivamente) (Rath et al. 2003).

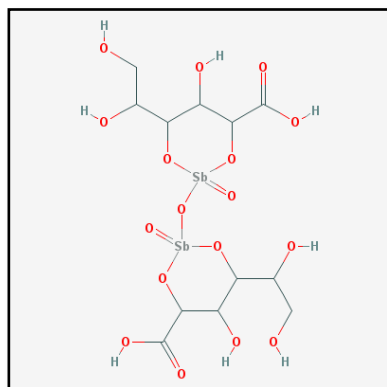


Fig. 17a. Estibogluconato de sodio (Pentostan®); Fórmula molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{17}\text{Sb}_2$; Peso molecular: 679.797.

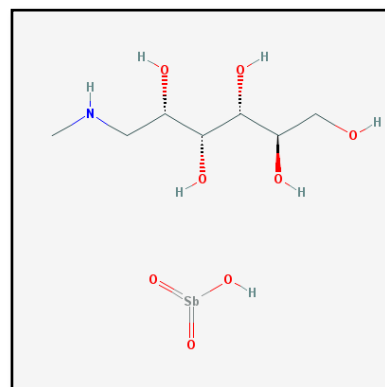


Fig. 17b. Antimoniato de meglumina (Glucantime®); Fórmula Molecular: $\text{C}_7\text{H}_{18}\text{NO}_8\text{Sb}$; Peso molecular: 365.979.

Hasta el momento no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los Sb^{V} (Fig. 18). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que actúan como un pro-fármaco, mediante un proceso de biorreducción del Sb^{V} en Sb^{III} , que activaría el mecanismo leishmanicida. El Sb^{III} interfiere en el balance oxidoreductor del parásito, siendo capaz de estimular el stress oxidativo/nitrosativo en los macrófagos infectados y por tanto, podría activar la respuesta inmune del hospedador (Wyllie et al. 2004).

El mecanismo de conversión del Sb^{V} en Sb^{III} podría estar mediado por la enzima reductasa-tiol-dependiente (TDR-1), que solo tendrá lugar en los amastigotes y no en promastigotes (Denton et al. 2004). Otros promotores de esta reducción serían la tripanotona, cisteína y cisteínil-glicina (Ferreira dos et al. 2003).

Los Sb^{III} tienen la capacidad de inhibir la tripanotion-reductasa (TR). Esta inhibición requiere la reducción de la TR por acción de la nicotinamida adenina

dinucleótido - fosfato (NADPH) (Baiocco et al. 2009). En modelos *in vivo*, se ha visto que los antimoniales interfieren con el metabolismo de la tripanotona por la inducción de un flujo rápido de tripanotona y glutatión intracelular hacia el espacio extracelular de los amastigotes (Cunningham & Fairlamb 1995; Wyllie et al. 2004). Esta salida de tripanotona y glutatión activa el mecanismo leishmanicida e induce la acumulación de tioles que disminuyen el efecto tampón, afectando al potencial oxido-reducción del amastigote (Wyllie et al. 2004). Por otro lado, además de la fragmentación del ADN, el Sb^{III} induce apoptosis en amastigotes y la externalización de la fosfatidilserina por un mecanismo independiente de las caspasas (Serenio et al. 2001).

Finalmente, se cree que los Sb^V podrían jugar un papel importante en la activación de las funciones fagocíticas de los monocitos y los neutrófilos, ya que se ha observado que el Glucantime® incrementa la producción de óxido nítrico y el $TNF-\alpha$, evitando así la evasión de la respuesta inmunológica de *Leishmania* (Muniz-Junqueira & de Paula-Coelho 2008).

La resistencia a los antimoniales es una cuestión crítica en la epidemia del Kala-azar en la India, donde cerca del 60% de los pacientes no responden eficazmente a estos fármacos de primera elección (Sundar et al. 2000; Sundar et al. 2001b). En Latinoamérica, los fallos terapéuticos en el tratamiento de la leishmaniosis con los Sb^V son más evidentes en Brasil, Venezuela, Perú, Argentina y Colombia (Rojas et al. 2006).

En Bolivia, los Sb^V son los fármacos de elección para el tratamiento de la leishmaniosis. En un estudio de seguimiento se ha visto que la eficacia del tratamiento variaba entre el 75 y 94% (94% en la LC y 75% en la LMC). Por otro lado, el 7% de los pacientes no respondían favorablemente al tratamiento y, aunque se desconoce la causa, se presume que es debido al uso de productos genéricos (García et al. 2009).

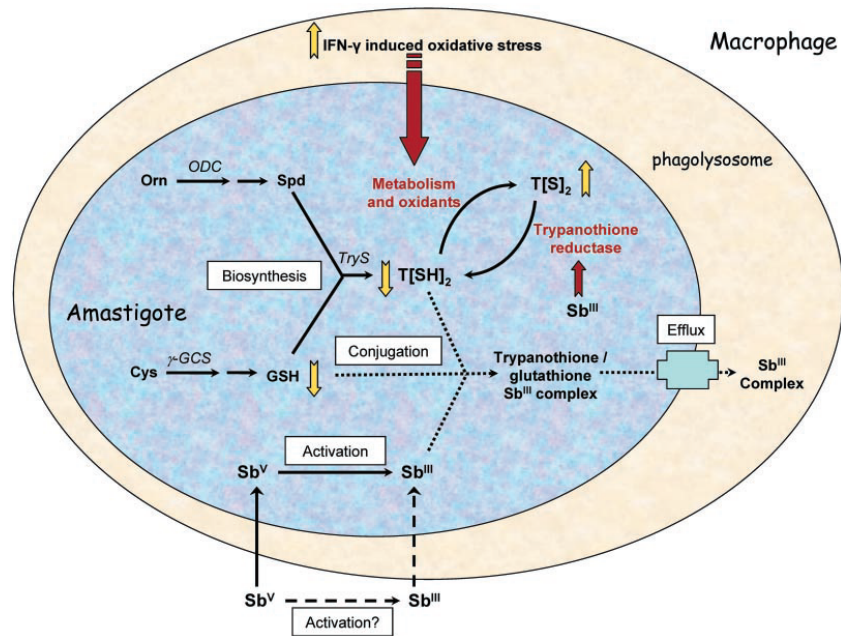


Fig. 18. Mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes. En células sensibles a los antimoniales, se limita la capacidad de flujo de la tripanotona y el glutatión por acción implícita de la ornitina-descarboxilasa (ODC) y la γ -glutamyl-cisteinsintetasa (γ -GCS). El estrés oxidativo es inducido por el IFN- γ , que activa los radicales intermediarios de nitrógeno, por medio de la oxido-nítrico-sintasa, el complejo NADPH-oxidasa y la acumulación de antimoniato. Abreviaturas: GSH, glutatión; Orn, Ornitina; Spd, espermidina; Trys, tripanotión sintetasa; T(SH)₂, tripanotión. Reproducido de (Wyllie et al. 2004).

La resistencia a los antimoniales podría deberse a múltiples factores. En modelos *in vitro* se ha determinado que las cepas de *Leishmania* resistentes al Sb^{III} sobreexpresan la proteína de shock térmico *HSP83*, en comparación con las cepas sensibles al Sb^{III} (Vergnes et al. 2007). También se ha evidenciado la sobreexpresión de los genes de la histona H2A en cepas de *L. donovani* resistentes al Sb^{III} (Singh et al. 2010). Otro posible mecanismo de resistencia al Sb^{III} podría ser la tolerancia al estrés oxidativo, mediado por la reducción en la expresión de los genes de la tripanotión-reductasa (Carter et al. 2005; Carter et al. 2006; Decuyper et al. 2012). A nivel del sistema inmunológico, las cepas de *L. donovani* resistentes al Sb^{III} son capaces de modular la producción de IL-10 por parte de los macrófagos (Mukhopadhyay et al. 2011).

Anfotericina B (AnB).

Fue aislada en 1953 a partir del actinomiceto *Streptomyces nodosus* por Charles E. Smith de los Laboratorios Squibb (Dutcher 1968), determinándose en 1956 sus propiedades antifúngicas (Gallis et al. 1990). Es un antibiótico poliénico que contiene 47 átomos de carbono y está formado por un anillo macrólido. Es anfótero, anfifílico e insoluble en agua (Fig.19). Tiene la capacidad de formar sales solubles en medio ácido o básico y cuando se añade desoxicolato de sodio, forma una dispersión coloidal soluble, siendo ésta la formulación convencionalmente utilizada que se comercializa como Fungizona® (Gallis et al. 1990).

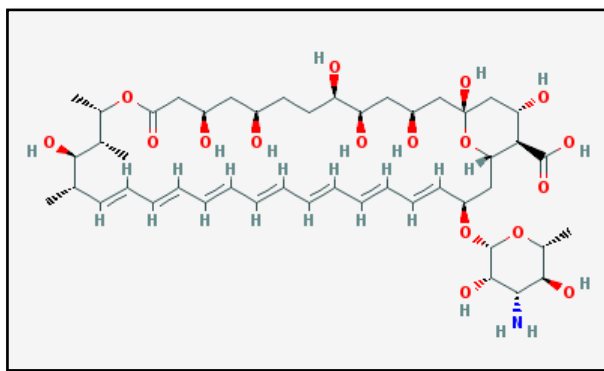


Fig. 19. Anfotericina B Fórmula molecular: $C_{47}H_{73}NO_{17}$; Peso molecular: 924.079.

En 1965, La AnB fue aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos como el primer agente antifúngico (Filippin & Souza 2006). En 1959 se comprobó por primera vez su acción leishmanicida en estudios *in vitro* (Furtado et al. 1960) y en 1960, en Brasil, empezando a emplearse como alternativa terapéutica en pacientes con lesiones mucosas, mucocutáneas y cutáneas características de la leishmaniosis tegumentaria americana (Sampaio et al. 1960; Sampaio et al. 1971). Actualmente, la formulación lipídica de AnB, Ambisome®, es el fármaco de primera elección en el tratamiento de la leishmaniosis visceral en zonas con resistencia a los antimoniales (Legrand et al. 1992; WHO 2010a).

A pesar de que el mecanismo de acción de la AnB no ha sido aún completamente elucidado, parece que la acción de la AnB tiene lugar a dos niveles diferentes (Fig. 20):

- 1) Uniéndose al ergosterol y dando lugar a la formación de poros o bien “secuestrando” el ergosterol de la membrana celular.
- 2) Induciendo estrés oxidativo celular (Brutyan & McPhie 1996; Neumann et al. 2010).

La AnB se une al ergosterol por la parte hidrofóbica de la molécula (Brajtburg et al. 1990). Esta unión promueve la formación de poros e incrementa la permeabilidad de la membrana, permitiendo una rápida depleción de iones intracelulares (cationes K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}), que dan lugar a la muerte celular (Kinsky 1970; Baginski et al. 2006). Otros estudios han propuesto que la letalidad de la AnB podría ser más compleja, pues se cree que es capaz de inducir la auto-oxidación y formación de radicales libres en el parásito (Lamy-Freund et al. 1985). También parece estar implicada la inducción del movimiento iónico y el estrés oxidativo, de forma que el daño celular estaría asociado a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediada por la AnB (Brajtburg et al. 1990).

La liberación de radicales libres (ROS y NO), modula la respuesta mediada por las citoquinas pro-inflamatorias, incrementando las concentraciones de IFN- γ e IL-12 y disminuyendo drásticamente las concentraciones de IL-10 y TGF- β . También restaura la respuesta Th1 por la vía de la protein kinasa-C (Saha et al. 2007; Mukherjee et al. 2010).

La AnB puede presentar tres estados de agregación (monomérico, oligomérico y poliagregado) (Mazerski et al. 1990; Legrand et al. 1992; Mazerski & Borowski 1995, 1996).

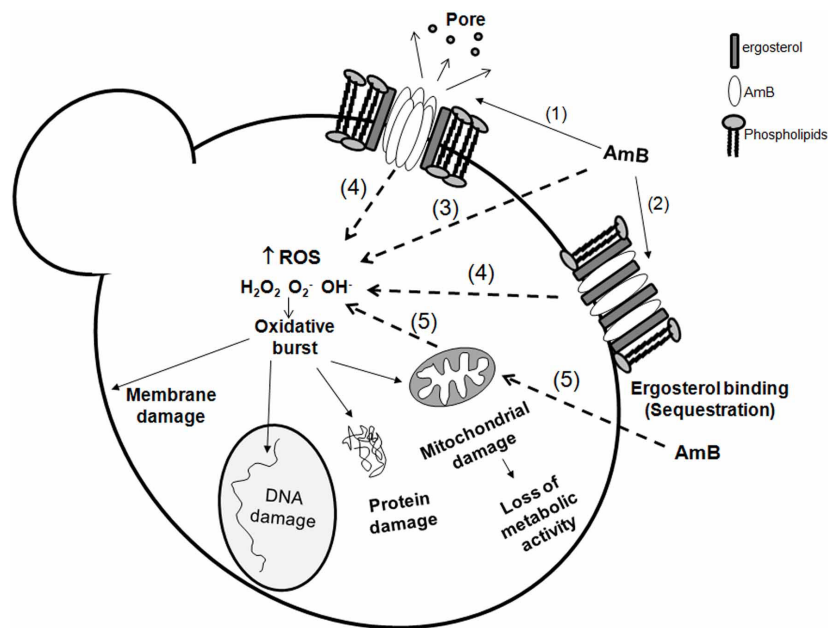


Fig. 20. Mecanismo de acción de la AnB en células fúngicas. Adaptado de (Mesa-Arango et al. 2012). La AnB ejerce su acción a diferentes niveles en la célula: sobre la membrana y a nivel intracelular. En la membrana, se une al ergosterol (1) y forma poros, o simplemente induce el secuestro de ergosterol (2), que conlleva a la inestabilidad de la membrana. En el citoplasma, la AnB induce el estallido oxidativo por diversos mecanismos: actúa directamente como un pro-oxidante (3) e induce la acumulación de ROS. Este efecto intracelular requeriría la unión al ergosterol (4). Los ROS son metabolitos de la cadena respiratoria, por lo que no se puede descartar que la AnB influya en la actividad mitocondrial (5), y contribuya de esta manera a la ruptura oxidativa. La acumulación de radicales libres tiene múltiples efectos letales sobre los componentes esenciales de la célula (membrana, proteínas, ADN y mitocondrias) que conllevan a la muerte celular.

El estado de agregación de la AnB es un parámetro complejo ya que condiciona no solo la toxicidad sino también la actividad y la farmacocinética del fármaco. Es un parámetro difícil de controlar, ya que en solución existe un complejo equilibrio entre las diferentes especies (monómero, dímero y poliagregado) el cual puede verse alterado cuando la formulación es diluida. Por ello es muy importante tener en cuenta el estado de agregación en el desarrollo galénico de las formulaciones (Torrado et al. 2008).

Hay pocos estudios en relación al mecanismo de resistencia a la AnB, pero se sabe que los aislados resistentes de *L. donovani*, pueden presentar alteración de

los esteroides de la membrana por disfuncionalidad de los genes SCMT (S-adenosil-L-metionina: C-24- Δ -esterol metiltransferasa). Sin embargo, una pequeña cantidad de AnB puede ser captada por el parásito y otra puede ser excretada a través de la sobre-expresión de proteínas de membrana MDR1, el remanente intracelular de AnB activaría los ROS, pero este efecto podría ser controlado por la cascada de la triparedoxina del metabolismo de los tioles. Las enzimas terminales de la cascada triparedoxina CTP del citosol y MPT de la mitocondria podrían escindir los ROS. La regulación de la cascada de la tripanoredoxina y la membrana MDR1 serían las responsables de conferir la resistencia a *L. donovani* (Purkait et al. 2012).

Los efectos adversos observados después de la administración de AnB son escalofríos, fiebre, náuseas, temblor, vómitos, dolor de cabeza, hipocalcemia, hipernatremia, diuresis aumentada (Mora-Duarte et al. 2002), rara vez ocurren alteraciones cardiovasculares como hipertensión, hipotensión y arritmia cardíaca, (Mora-Duarte et al. 2002; Gerbaud et al. 2003), siendo el principal efecto adverso la nefrotoxicidad (Gerbaud et al. 2003). Los efectos neurotóxicos son muy raros y se ha descrito cardiotoxicidad en pacientes con función renal disminuida seguida de descompensación electrolítica (Legrand et al. 1992; Marzzullo et al. 1997; Schoffski et al. 1998; Gerbaud et al. 2003).

Por otro lado, se han realizado numerosas formulaciones de la AnB con la intención de reducir su toxicidad y mejorar, por lo tanto, su índice terapéutico. En la Tabla 3, se presenta un resumen de las formulaciones que se pueden obtener en el mercado.

Tabla 3. Formulaciones de AnB usadas en el tratamiento clínico de la leishmaniosis visceral (Mohamed-Ahmed et al. 2012).

Formulación	Composición (ratio molar)	Eficacia clínica	Toxicidad (DL ₅₀ mg/kg)	Coste/ vial	Referencia
Fungizona®	AnB: deoxicolato (2 : 1)	Pacientes con <i>L. donovani</i> 93% de cura 1mg/Kg/48h/15 dosis/India Pacientes con <i>L. donovani</i> resistente a Sb ^V 95% de cura 1mg/Kg/48h/15 días/India	2,3 en ratones; 1,6 en ratas; 5,1 en cobayos	7,5 USD	(Patterson et al. 1989; Proffitt et al. 1991; Das et al. 2009; Sundar et al. 2010; WHO 2010b)
Fungisoma	Fosfatidilcolina: colesterol (7:3) AnB/lípido 2,2% (liposoma)	Pacientes con <i>L. donovani</i> 90% de cura 10mg/Kg/uni-dosis/India	17,6 en ratones	120 USD	(Jadhav et al. 2010; Mondal et al. 2010)
ABLE	AnB deoxicolato en emulsión lipídica (aceite de soja y lecitina de huevo)	Pacientes con <i>L. donovani</i> 100% de cura 15mg/Kg/uni-dosis/India Pacientes con <i>L. donovani</i> 87% de cura/2 dosis/India	Leve toxicidad relacionada a la infusión	10 USD	(Sundar et al. 2009)
Amphomul	Colesterilsulfato :AnB (1:1)(complejo lipídico, dispersión coloidal)	Eficacia Total 15 mg/kg tratamiento de la LV	No registrada	10 USD	(Alvar et al. 2008)
Amphocil (ABCD)	Colesterilsulfato :AnB (1:1)(complejo lipídico, dispersión coloidal)	Pacientes con <i>L. donovani</i> 97% de cura/ 7,5mg/Kg dosis total (primer día 0,5mg/Kg; segundo día 1mg/Kg; tercer al sexto día 1,5mg/Kg) India	>100 en ratones y 50 en cobayos	£ 104.10	(Patterson et al. 1989; Alvar et al. 2008; Sundar et al. 2011)
Abelcet (ABLC)	Dimiristoilfosfatidilcolina:dimirist oilfosfatidilglicerol:AnB (7:3:10) (complejo lipídico).	Pacientes con <i>L. infantum</i> > 95% de cura 3mg/Kg/día/5 días/en Cyprus	>40 en ratones	£ 82.13	(Clark et al. 1991; Alvar et al. 2008; Gradoni et al. 2008)
AmBisome	Soja hidrogenada fosfatidilcolina: colesterol: distearoilfosfatidilglicerol:AnB (2:1:0,8:0,4) (liposomas)	Pacientes con <i>L. donovani</i> 97,5% de cura 5mg/Kg/1 dosis/India	>175 en ratones; 50 en ratas	18 USD	(Proffitt et al. 1991; WHO 2010b; Sundar et al. 2011)

Miltefosina (ML)

Químicamente es una hexadecilfosfocolina (Fig. 21), fue sintetizada por primera vez en 1982 por Bill Pendergast y Joseph Chanes como parte de un programa de antiinflamatorios. Es un análogo sintético de la fosfatidilcolina, con actividad anticancerígena (Croft & Engel 2006). Posteriores ensayos demostraron que tenía actividad leishmanicida (Berman 2005).

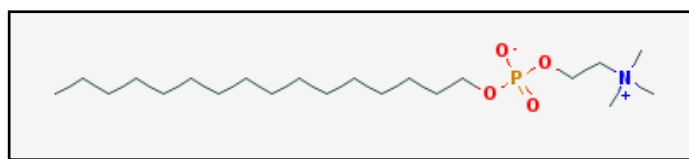


Fig. 21. Miltefosina: Hexadecilfosfocolina o Hexadecilfosforilcolina, Formula molecular: $C_{21}H_{46}NO_4P$; Peso molecular: 407.568.

Los estudios *in vitro* sobre formas promastigotes y amastigotes de *L. donovani* (MHOM/ET/67/L82; DD8 y LRC-L51), *L. infantum* (STI-172), *L. aethiopica* (MHOM/ET/84/KH), *L. tropica* (MHOM/AF/82/K001), *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21 y MNYC/BZ/62/M379), *L. panamensis* (MHOM/PA/67/Boynton) y *L. major* (HOM/85/SA/JISH118), junto a los estudios *in vivo* en ratones BALB/c, demostraron cura total en *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) major*, así como la reducción significativa de la carga parasitaria (mayor al 95%) en *L. (L.) infantum* y *L. (L.) donovani* (Sindermann et al. 2004).

Aunque el mecanismo de acción sobre *Leishmania* no está definido, se postula que es capaz de alterar el metabolismo de los lípidos, inducir apoptosis, desestabilizar las funciones mitocondriales y reactivar el sistema inmunológico (Fig. 22) (Dorlo et al. 2012).

Se ha descrito que la ML altera las funciones enzimáticas de la dietil-acetona-fosfato, acetil-transferasa, sn-l-acyl-2-liso-glicerofosfocolina y sn-l-alquil-2-liso-glicero-3-fosfocolina-acetiltransferasa, que participan en el metabolismo de los

lípidos de membrana (glicosil-fosfatidil-inositol, glicoproteínas y glicolípidos) (Rakotomanga et al. 2007). Otros estudios muestran que además altera el metabolismo intermedio de la síntesis de la fosfatidilcolina necesaria para la formación de acil- y alquil-glicerofosfolípidos en los glicosomas del parásito. A este nivel, la miltefosina interfiere la alquilglicosomal-acil-CoA-acetiltransferasa en forma dosis dependiente (Lux et al. 2000; Murray et al. 2000; More et al. 2003; Verma & Dey 2004; Perez-Victoria et al. 2006).

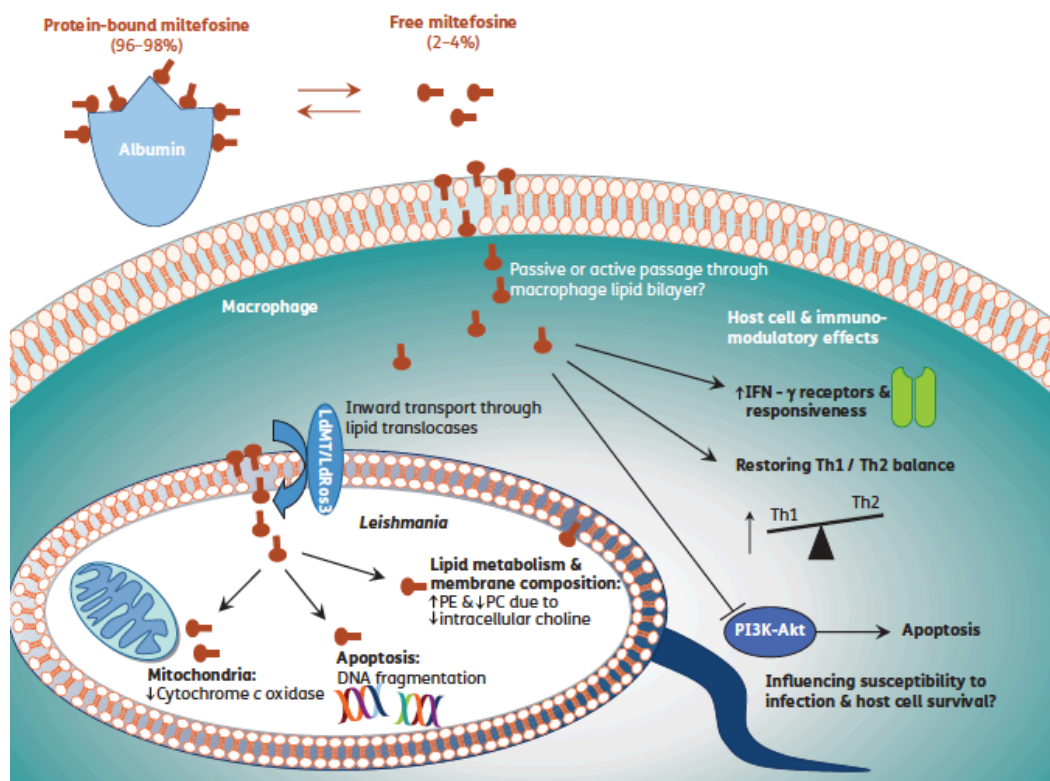


Fig. 22. Mecanismo de acción de la miltefosina sobre *Leishmania* (Dorlo et al. 2012).

También se ha descrito que la ML induce apoptosis por condensación y fragmentación del ADN nuclear con pérdida del volumen celular (Verma & Dey 2004).

Por último se ha propuesto que la ML reactiva las funciones inmunomoduladoras del macrófago, promoviendo la liberación de citoquinas y exacerbando a los receptores del IFN- γ , restaurándose además el balance Th1/Th2 en macrófagos

infectados. Además estimula la respuesta Th1 mediada por la IL-12 (Wadhone et al. 2009; Dorlo et al. 2012).

En 2002, la miltefosina fue autorizada en la India como el primer tratamiento oral para la LV y actualmente está autorizada en Europa, América, Asia y África (Alvar et al. 2012). Sin embargo, hubo que esperar hasta el año 2010 para ser incluida en la lista de medicamentos esenciales de la OMS, lo cual ralentizó su uso en otras áreas geográficas más desfavorecidas donde la LV es endémica.

Paromomicina

También llamada aminosidina (Fig.23), es un antibiótico aminoglucósido que fue aislado en 1950 de *Streptomyces krestomuceticus* y de *Streptomyces rimosus*. Es usado en el tratamiento de enfermedades bacterianas y de protozoos parásitos tales como *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis* y *Dientamoeba fragilis* (Sundar & Chakravarty 2008).

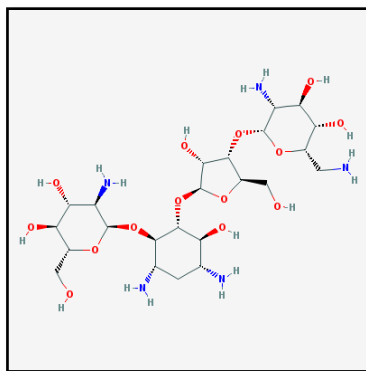


Fig. 23. Paromomicina (aminoglucósido), Aminosidin. Fórmula molecular: $C_{23}H_{45}N_5O_{14}$; Peso molecular: 615.628.

En la década de 1980, se demostró su eficacia en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea y visceral, tanto vía parenteral como tópica (Sundar & Chatterjee 2006). En la India, los ensayos clínicos en Fase-III para el tratamiento de la leishmaniosis visceral culminaron con éxito, demostrando seguridad y eficacia. Actualmente los ensayos clínicos en fase-IV continúan en proceso,

mientras tanto, los primeros resultados del seguimiento de la terapia clínica controlada en más de 500 pacientes, culminaron con una curación del 99,6 %, en aquellos pacientes que completaron la terapia, que consistió en la administración parenteral de 11 mg/Kg/día/21 días (Sinha et al. 2011).

Las formulaciones tópicas y parenterales de Paromomicina están recomendadas para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea y visceral respectivamente, y su eficacia no difiere del Sb^V en administración parenteral (Kim et al. 2009).

El mecanismo de acción es bastante específico. Se une a la subunidad ribosomal 30S y bloquea la iniciación de la síntesis de proteínas, por medio de la fijación del complejo ribosomal 30S–50S en el codón de iniciación del ARNm, donde se acumula este complejo. También altera la información del ARNm, lo que conlleva a la inserción incorrecta de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas sintetizadas (Sundar & Chakravarty 2008). Otros estudios sugieren que la paromomicina puede afectar el metabolismo energético mitocondrial, alterando la permeabilidad a nivel de las proteínas de membrana (Maarouf et al. 1997; Jhingran et al. 2009).

En la utilización de la paromomicina se recomienda especial atención para prevenir la aparición de resistencias, por lo que se recomienda el uso combinado con otros fármacos para el tratamiento de la leishmaniosis. En este sentido, la paromomicina ha demostrado gran capacidad sinergizante en combinación con los Sb^V, acortando a 17 días el periodo de tratamiento, sin embargo sus propiedades antibacterianas se ven disminuidas (Sundar & Chakravarty 2008). Es importante resaltar que la paromomicina no es tóxica para las células del hospedador (Fernández et al. 2011). No se han registrado casos de resistencia a la paromomicina por lo que se perfila como un interesante candidato para el tratamiento de la leishmaniosis visceral, cutánea y mucocutánea, principalmente en las terapias combinadas.

Pentamidina

La pentamidina, pertenece al grupo de las diamidinas (Fig. 24), su eficacia en el tratamiento de la Tripanosomiasis Humana Africana fue descrita por Lourie y Yorke en 1937-1938 (Wispelwey & Pearson 1991; Bray et al. 2003).

Varios estudios determinaron que la pentamidina, presenta un amplio espectro de acción antibacteriano, antifúngico y antiparasitario (*Trypanosoma*, *Plasmodium* y *Leishmania*). Debido a su toxicidad, queda como tratamiento alternativo de las leishmaniosis. Se comercializa con el nombre de lomidine®.

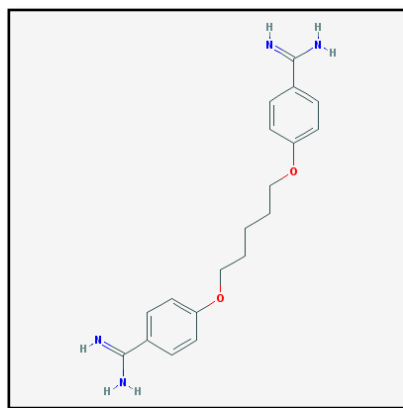


Fig. 24. Pentamidina. Formula molecular:

$C_{19}H_{24}N_4O_2$; Peso molecular: 340.419.

El mecanismo de acción no está del todo claro, aunque parece que la pentamidina actúa inhibiendo la biosíntesis de poliaminas, se une al surco menor del ADN mitocondrial y afecta al potencial de membrana mitocondrial (Bray et al. 2003). Otros estudios señalan que la pentamidina entra al parásito por la acción de mediadores del transporte a través de la membrana. Algunos cationes divalentes podrían ser los responsables del transporte de la pentamidina, pero su papel aún no está del todo esclarecido (Basselin et al. 2002; Bray et al. 2003).

La aparición de resistencias es muy rápida, por lo que su uso ha disminuido en zonas endémicas como la India (Singh & Sivakumar 2004).

OTRAS ALTERNATIVAS FARMACOLÓGICAS

Alopurinol

El alopurinol es un análogo de las purinas (hipoxantina). Es un fármaco que se utiliza en el tratamiento de la gota. Fue utilizado por primera vez contra la leishmaniosis en los años 80. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de enzimas de la ruta de las purinas como la xantina-oxidasa. Este compuesto es metabolizado por *Leishmania* produciendo un análogo de inosina inactivo, frenando así el metabolismo de las purinas (Nelson et al. 1979).

La mayor ventaja que ofrece el alopurinol es que no suele generar efectos secundarios, por lo que se recomienda su uso en casos con nefritis crónica debida a leishmaniosis (Plevraki et al. 2006). Sin embargo, se ha demostrado que este compuesto por sí solo no es capaz de eliminar por completo los parásitos del organismo (Cavaliero et al. 1999; Koutinas et al. 2001). Es usado como terapia habitual en la leishmaniosis canina y felina. Sin embargo, se recomienda su uso en las terapias múltiples combinadas en pacientes coinfectados por *Leishmania*/VIH (Grabmeier-Pfistershammer et al. 2012).

Azoles y derivados

Los derivados azólicos fueron desarrollados originalmente como compuestos antifúngicos debido a su capacidad de inhibir la ruta de biosíntesis de los esteroides. *Leishmania* comparte este lípido de membrana con los hongos, por lo que también es sensible a estos fármacos (Croft & Coombs 2003). Los compuestos azólicos consiguen lisar el parásito al alterar la composición de su membrana, lo que aumenta su permeabilidad. Se piensa que afectan a la ruta biosintética del ergosterol al inhibir el citocromo P450. En el caso concreto del tratamiento de la leishmaniosis, destacan el ketoconazol, el itraconazol y el fluconazol. No existen notables diferencias especie-específicas en cuanto a la sensibilidad a estos compuestos (Singh & Sivakumar 2004).

Sitamaquina

Es un derivado de la 8-aminoquinolina, también conocida como WR6026. En 1979 se describió su actividad leishmanicida, y es una nueva alternativa de tratamiento de la leishmaniosis, ya que se puede administrar por vía oral. Actualmente se encuentra en la tercera fase de ensayos clínicos en la India y Kenia, aunque se han descritos algunos casos de nefrotoxicidad durante esta fase (Yeates 2002).

La sitamaquina altera la morfología del parásito. Puede atravesar la membrana celular e interaccionar con dianas intracelulares, a nivel de la mitocondria y los acidocalcisomas. Se ha propuesto que la sitamaquina es una molécula anfifílica y catiónica que puede interactuar con los lípidos de membrana del parásito, provocando una rápida y extensa alcalinización de estos, sumado a la formación de vacuolas ácidas (acidocalcisomas) que contienen iones sodio, calcio, magnesio, zinc y fosforo (Duenas-Romero et al. 2007).

Imiquimod

Es una imidazoquinolinamina (1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo(4,5-c)quinolin-4-amine) que fue aprobada por la FDA de los Estados Unidos para su uso tópico al 5% en crema (Aldara; 3M Pharmaceuticals). Se emplea en el tratamiento de las enfermedades de origen viral (Arevalo et al. 2001).

Es un inmunomodulador que induce la secreción de IFN- α , IL-1 β , IL-6 y el TNF- α . En ensayos *in vitro* se ha visto que el Imiquimod y Resiquimod ejercen su acción leishmanicida de forma indirecta, por medio de la inducción de la síntesis y liberación de óxido nítrico intracelular, que eliminaría los amastigotes de *Leishmania* (Arevalo et al. 2001; Dockrell & Kinghorn 2001).

DESARROLLO DE NUEVAS ALTERNATIVAS FARMACOTERAPÉUTICAS

En las últimas décadas se ha dado un nuevo impulso al descubrimiento de fármacos frente a *Leishmania*. Este resurgimiento se debe a diversos factores como el conocimiento de la biología, el metabolismo bioquímico y el genoma del parásito; además de las nuevas técnicas químicas, herramientas bioinformáticas y las colaboraciones inter-institucionales (Monzote 2009).

Actualmente los compuestos derivados de síntesis química y los productos naturales tienen relevancia en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas (Monzote 2009), debido al reducido arsenal terapéutico disponible en la actualidad y a la aparición de resistencias frente a los fármacos convencionales.

PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL

Las plantas medicinales se constituyen en la fuente de productos naturales más estudiadas. Muchos compuestos utilizados actualmente en la terapia de enfermedades infecciosas se han aislados de plantas. Sin embargo, en los últimos 30 años, solo se han registrado unas 60 entidades químicas, obtenidas a partir de plantas medicinales, de los cuales solamente la artemisina es utilizada hoy en día en el tratamiento de la malaria (Newman & Cragg 2012). A pesar de ello, las plantas medicinales constituyen sin lugar a dudas la base para el descubrimiento de nuevos fármacos.

Se han evaluado diferentes entidades químicas o fracciones obtenidas a partir de diversas plantas, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* que han demostrado tener actividad leishmanicida (Kayser et al. 2000). Una muestra representativa se resume en la Tabla 4.

Los grupos químicos más interesantes como leishmanicidas son fundamentalmente alcaloides y flavonoides.

Tabla 4. Productos naturales con actividad leishmanicida adaptado de (Monzote 2009).

Compuesto	Origen Natural	Actividad anti- <i>Leishmania</i>	Referencia
2 Alcaloides canthin-6-ona	<i>Zanthoxylumch iloperone</i>	Buena eficacia en modelo <i>in vivo</i> en ratones BALB/c infectados con <i>L. amazonensis</i>	(Ferreira et al. 2002)
Coronaridina	<i>Peschieraaustr alis</i>	Presenta actividad <i>in vitro</i> frente a promastigotes y amastigotes de <i>L. amazonensis</i>	(Delorenzi et al. 2001)
Licochalcone-A	<i>Chineselicorice</i>	Presenta actividad <i>in vitro/in vivo</i> frente a <i>L. major</i> y <i>L. donovani</i>	(Chen et al. 1993)
Maesabalida III	<i>Maesa balansae</i>	Presenta actividad <i>in vitro/in vivo</i> frente a <i>L. donovani</i>	(Maes et al. 2004)
Parthenolida	<i>Tanacetumpart henium</i>	Presenta actividad <i>in vitro</i> frente a promastigotes y amastigotes de <i>L. amazonensis</i>	(Tiuman et al. 2005)
Plumbagina	<i>Pera benensis</i>	Eficacia <i>in vivo</i> en ratones BALB/c infectados con <i>L. amazonensis</i> y <i>L. venezuelensis</i>	(Fournet et al. 1992)
Trichothecenas	<i>Holarrhenaflori bunda</i>	Presenta actividad <i>in vitro</i> frente a promastigotes y amastigotes de <i>L. donovani</i>	(Loukaci et al. 2000)

Los flavonoides son un amplio grupo de compuestos fenólicos que poseen un grupo flavánico básico con dos anillos aromáticos, interconectados por un anillo heterocíclico de tres átomos de carbono. En un estudio donde se analizaron más de 100 flavonoides, dos derivados, la quercetina y 7,8-dihydroxyflavona mostraron una interesante actividad *in vivo* frente a *L. donovani* (Tasdemir et al. 2006). La quercetina y la luteonina parecen actuar sobre la rotura del ADNk de los minicírculos mediado por la topoisomerasa II del parásito, y además inducen apoptosis. En el caso de la luteonina, los estudios *in vivo*, en un modelo de leishmaniosis visceral en criceto, han demostrado una reducción de la carga parasitaria del 80% (Mittra et al. 2000). Estudios más recientes indican que la quercetina y otros derivados flavonoides como la quercetrina y la isoquercitrina, interactúan sobre la arginasa, enzima fundamental en la síntesis de las poliaminas necesarias para el parásito (da Silva et al. 2012).

La licochalcona A, una chalcona oxigenada aislada de las raíces de *Glycyrrhiza glabra*, parece tener efecto leishmanicida *in vitro* sobre promastigotes y

amastigotes de *L. major* y *L. donovani*. Además, la administración de licochalcona A, a ratones infectados con *L. major*, evitó el desarrollo de las lesiones características, reduciendo en más del 96% la carga parasitaria en cricetos infectados con *L. donovani* (Chen et al. 1993). Su mecanismo de acción podría estar relacionado con las alteraciones ultraestructurales y respiratorias de las deshidrogenasas a nivel de la mitocondria del parásito, además de inhibir la síntesis de ADN (Zhai et al. 1999).

Los alcaloides son metabolitos secundarios de las plantas que, de forma general, se sintetizan a partir de aminoácidos y contienen un grupo nitrogenado. Son especialmente importantes para las plantas ya que los utilizan para defenderse de una gran variedad de microorganismos y herbívoros. Además, en la literatura se han descrito numerosos alcaloides con una excelente actividad leishmanicida, por lo que, aunque hasta el momento ninguno ha llegado hasta la fase de estudios clínicos, suponen una potencial fuente de fármacos frente a *Leishmania* (Mishra et al. 2009).

Químicamente, los alcaloides presentan diversas estructuras, pero entre los más interesantes por su actividad frente a *Leishmania* están los indoles, alcaloides diterpénicos, isoquinolinas o las quinolinas. Entre los indoles está la harmalina, cuyo mecanismo de acción parece basarse en actuar como agente intercalante o interfiriendo en el metabolismo de aminoácidos (Mahiou et al. 1994). Otros indoles como la dihidrocorinanteina, corinanteina y la corinanteidina (extraídos de la Rubiaceae, *Corynanthe pachyceras*) han demostrado una actividad *in vitro* de ~3 μM frente a *L. major* y parecen actuar inhibiendo la cadena respiratoria del parásito (Staerk et al. 2000). A partir de la cianobacteria *Lyngbya majuscula* se han obtenido una serie de alcaloides indólicos, Dragonamidas A y E y herbamida B, que presentaban una buena actividad frente a *Leishmania in vitro*, con valores de IC_{50} de 6.5, 5.1, y 5.9 μM respectivamente (Balunas et al. 2010).

Entre los alcaloides diterpénicos están 15,22-O-Diacetil-19-oxo-dihidroatisina, azitina y la isoazitina aislados de *Aconitum*, *Delphinium* y *Consolida*. Estos

compuestos han demostrado actividad *in vitro* frente a promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. infantum*, con IC₅₀ inferiores a las de la pentamidina (Gonzalez et al. 2005).

Entre los alcaloides isoquinolínicos se han descrito dos oxoaporfinas, *O*-metilmoscatolina y liriodenina, aisladas de *Annona foetida* (Annonaceae), que han demostrado ser activas frente a promastigotes de *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (Costa et al. 2006). La berberina, es un análogo isoquinolínico presente en muchas familias de plantas como las Annonaceas, Menispermaceas y las Berberifaceas, habiendo demostrado una buena actividad leishmanicida, a una concentración de 10µg/mL, en amastigotes intracelulares de *L. major* (Birdsall & Kelly 1997).

Entre los alcaloides más prometedores, como leishmanicidas, están los de tipo quinolina. Así, se han descrito la 2-n-propylquinolina, 2-(1',2'-trans-epoxypropyl) quinolina o chimanina-D y la chimanina-B aisladas de *Galipea longiflora* una rutácea de origen boliviano, que han demostrado ser activas frente a promastigotes de *L. braziliensis* con una IC₉₀ de 50, 25 y 25 µg/mL, respectivamente (Chan-Bacab & Peña-Rodriguez 2001). De otra rutácea, *Dictyoloma peruviana*, se han aislado otras quinolinas, la dictilomida A y la B, activas frente a promastigotes de *L. amazonensis* a 100 µg/mL (Lavaud et al. 1995). *Raputia heptaphylla* es otra rutácea originaria de Sudamérica, que ha sido evaluada por su posible actividad leishmanicida. Entre los metabolitos aislados, una quinolina mostró una interesante actividad frente a *L. panamensis*, tanto frente a formas promastigotes como amastigotes (IC₅₀ 14,3 y 8,7µg/mL respectivamente) (Coy Barrera et al. 2011).

APLICACIÓN DE LA ETNOBOTÁNICA EN LA BÚSQUEDA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD LEISHMANICIDA

En la medicina tradicional de la zona andina de Sudamérica se recoge el uso de diversas plantas para el tratamiento de la leishmaniosis, entre ellas están la *Galipea longiflora* y diversas especies del género *Piper*.

Galipea longiflora

Es conocida en esta región por el nombre vernacular de Evanta y pertenece a la familia de las Rutáceas (Fig. 25). Es un árbol de hasta 12 metros de altura, con hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un peciolo frecuentemente alado, y flores en forma de racimos. En Bolivia se encuentra en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos de los Departamentos del Beni y La Paz. En el uso tradicional para el tratamiento de la leishmaniosis, se emplea la corteza fresca o seca molida y aplicada directamente como cataplasma sobre las úlceras, además de beber infusiones durante tres días (Killeen et al. 1993; Giménez et al. 2005).



Fig. 25. Árbol de Evanta (Fotografía cedida por cortesía: Dra. N. Flores IIFB-UMSA).

En el estudio fitoquímico se ha determinado la presencia de alcaloides de tipo quinolinas que presentaban actividad *in vitro* frente a *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani*, y eficacia *in vivo* en el modelo de leishmaniosis cutánea en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* (Fournet et al. 1994; Fournet et al. 1996). Estudios más recientes indican un papel inmunológico de dichos alcaloides en la leishmaniosis cutánea, inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias, tanto *in vivo* como *in vitro* (Calla - Magariños et al. 2013).

Piper

El género *Piper* pertenece a la familia *Piperaceae* y comprende más de 1.200 especies, ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo, la gran mayoría de las cuales se encuentran en los trópicos de América (> 700 especies), seguido por las del Sur de Asia (> 300 especies), donde tiene especial importancia económica y comercial *Piper nigrum* L. (pimienta negra) y *Piper betle* L. Los patrones de distribución de las especies de *Piper* varían desde especies endémicas hasta aquellas que presentan una amplia distribución geográfica (Florestais 2004).

Numerosas especies del género *Piper* tienen una gran popularidad en la medicina tradicional Ayurvedica de la India y América Latina (Kirtikar & Basu 1935). En América Latina, *P. amalago*, distribuida desde México hasta Brasil, se usa para aliviar dolores de pecho y como agente antiinflamatorio (Domínguez & Alcorn 1985).

En Bolivia es conocida con el nombre común de “matico”. Las etnias de los Tacanas y Mosetenes (Alto Beni-La Paz) hacen uso de las hojas de *Piper aduncum* (Fig. 26), para curar el resfriado y la fiebre; en la etnia de los Chacobo (Provincia Vaca Díez, Beni) se usa la planta entera de *P. lanceolatum*



Fig. 26. *Piper aduncum* (Fotografía cedida por cortesía: Dra. N. Flores IIFB-UMSA).

(“joshinia”) y *P. callosum* (“xequihahewa”) hervidas para los casos de viruela; mientras que *P. darienense* (“nihibosa”) y *P. hostmanianum* (“rarasá”) se utilizan como analgésico para el dolor de muelas. En la etnia Tacana utilizan las nervaduras de las hojas de *P. darienense* (“anu caperi”) para el dolor de muelas; y las hojas de *P. peltatum* (“richi-ina”, “sipu-sipu”) se aplican en forma de cataplasma en casos de inflamación. Las hojas de *P. aduncum* y *P. heterophyllum*

son utilizadas como antiinflamatorio, en el dolor de los riñones, como desinfectante en heridas y en infecciones de la piel (Quintana & Vargas 1995).

Las especies del género *Piper* han sido ampliamente investigadas y los estudios fitoquímicos han conducido al aislamiento de una amplia variedad de metabolitos secundarios (Parmar et al. 1997), destacando los alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, amidas chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas. Algunos ejemplos de metabolitos aislados y su actividad biológica sobre *Leishmania*, se resumen a continuación (Tabla 5).

Tabla 5. Productos naturales con actividad leishmanicida.

Compuesto	Origen	Eficacia*		Referencia
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
2',6'-Dihidroxi-4'-metoxi-chalcona	<i>Piper aduncum</i>	PR y AM de <i>L. amazonensis</i>	Nd	(Torres-Santos et al. 1999b)
Flavokavaina	<i>Piper rusbyi</i>	PR de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> y <i>L. donovani</i>	BALB/c/ <i>L. amazonensis</i>	(Flores et al. 2008)
Luteolina	<i>Vitex negundo</i>	AM de <i>L. donovani</i>	Criceto/ <i>L. donovani</i>	(Mittra et al. 2000)
Quercetina	<i>Fagopyrum esculentum</i>	AM de <i>L. donovani</i>	Criceto/ <i>L. donovani</i>	(Bringmann et al. 2000)
2',6',4-Acetiloxi-4'-metoxi-dihidrochalcona	<i>Piper elongatum</i>	PR de <i>L. braziliensis</i>	Nd	(Hermoso et al. 2003)
7,4',7'',3''',4'''-Penta-O-acetil-moreloflavona	<i>Garcinia brasiliensis</i>	AM y PR de <i>L. amazonensis</i>	Nd	(Gontijo et al. 2012)
Piplartina	<i>Piper retrofractum</i>	PR de <i>L. donovani</i>	Criceto/ <i>L. donovani</i>	(Bodiwala et al. 2007)
3,4-Dihidroxi-5-(3'-metil-2'-butenil)-benzoato de metilo	<i>Piper glabratum</i>	PR de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> y <i>L. donovani</i>	Nd	(Flores et al. 2008)
Ácido 3-(3,7-dimetoxi-2,6-octadienil) -4-metoxi-benzoico	<i>Piper aduncum</i>	PR de <i>L. braziliensis</i>	Nd	(Flores et al. 2009; Sen & Chatterjee 2011)
Arbortristósido A	<i>Nyctanthes arbor-tristis</i>	AM de <i>L. donovani</i>	Criceto/ <i>L. donovani</i>	(Tandon et al. 1991; Sen & Chatterjee 2011; Agrawal et al. 2013)
Ancistroealaina	<i>Ancistrocladus ealaensis</i>	AM de <i>L. donovani</i>	Nd	(Bringmann et al. 2000)

2-n-Propilquinoleína	<i>Galipea longiflora</i>	PR de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> y <i>L. donovani</i>	BALB/c/ <i>L. donovani</i>	(Fournet et al. 1994; Calla-Magariños et al. 2013)
Diospirina	<i>Diospyros montana</i>	PR de <i>L. amazonensis</i>	Nd	(Mukherjee et al. 2009)
Whitaferina A	<i>Whitania somnifera</i>	AM de <i>L. donovani</i>	Nd	(Sharma et al. 2009)
Ácido ursólico	<i>Pourouma guianensis</i>	AM de <i>L. amazonensis</i>	Nd	(Torres-Santos et al. 2004)
8-Epixantatina 1β,5β-epóxido	<i>Xanthium brasiliicum</i>	AM de <i>L. donovani</i>	Nd	(Nour et al. 2009)
15-Acetoxy-8β-(2-metilbutiriloxi)-14-oxo-4,5-cis-acantospermolida	<i>Acanthospermum hispidum</i>	PR de <i>L. mexicana</i>	Nd	(Ganfón et al. 2012)
Veraguensina	<i>Nectandra megapota mica</i>	PR de <i>L. donovani</i>	Nd	(da Silva Filho et al. 2008)
Difilina	<i>Haplophyllum bucharicum</i>	AM de <i>L. infantum</i>	Nd	(Di Giorgio et al. 2005)
Nirantina	<i>Phyllanthus amarus</i>	AM de <i>L. donovani</i>	BALB/c <i>L. donovani</i>	(Chowdhury et al. 2012)
(3S)-16,17-Didehidrofalcarninol	<i>Tridax procumbens</i>	AM de <i>L. mexicana</i>	Nd	(Martín-Quintal et al. 2010)

* Promastigotes (PR); amastigotes (AM); No determinado (Nd).

COMPUESTOS DE SÍNTESIS

Los productos de síntesis química son altamente ventajosos, porque son fáciles de obtener, normalmente a bajo coste, y en poco tiempo, casi siempre son novedosos y la propiedad intelectual no presenta complicaciones. Algunos compuestos de síntesis han demostrado actividad leishmanicida en modelos *in vitro/in vivo* (Tabla 6). Actualmente y debido a la facilidad y rapidez de los modelos *in vitro*, algunas industrias farmacéuticas están evaluando la actividad biológica de las librerías de sus compuestos químicos, por ejemplo: St. George y col de *MycoLogics, Inc.* han evaluado la actividad de 15.000 compuestos, de los cuales 3 (NSC #: 13512, 83633 y 351520) han presentado actividad frente a amastigotes de *L. major*, además verificaron que son seguros para el hospedador mamífero, lo que les perfila como posibles candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos (George et al. 2006a; Monzote 2009).

Tabla 6. Productos de síntesis química con actividad leishmanicida (Monzote 2009);

COMPUESTO	DISEÑO	ACTIVIDAD LEISHMANICIDA	REFERENCIA
Quinolinas 3-sustituidas	<i>Potencial activador de macrófagos</i>	Actividad leishmanicida <i>in vitro</i> frente a promastigotes y amastigotes de <i>L. chagasi</i>	(Tempone et al. 2005)
Azasteroles	<i>Inhibidor de la 24-metiltransferasa</i>	Actividad frente a promastigotes de <i>L. donovani</i> y amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i>	(Magaraci et al. 2003)
Edelfosine y Ilmofosine	<i>Nuevos derivados alquil-lipofosfolipidos</i>	Actividad <i>in vitro</i> frente a promastigotes y amastigotes de <i>L. donovani</i>	(Azzouz et al. 2005)
N-acetil-l-cisteína	<i>Precursor del glutatión</i>	Actividad <i>in vivo</i> frente a ratones BALB/c infectados con <i>L. amazonensis</i>	(Monteiro et al. 2008)
Nicotinamida	<i>Inhibidor de algunos NADIII deacetilasa dependiente</i>	Inhibe el crecimiento de promastigotes y amastigotes de <i>L. infantum</i>	(Serenio et al. 2005)
Perifosina	<i>Nuevos derivados alquil-lipofosfolipidos</i>	Presenta significativa actividad frente a promastigotes de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i> y <i>L. infantum</i>	(Cabrera-Serra et al. 2007)
Triazole SCH 56592	<i>Inhibe la vía de la síntesis de ergosterol</i>	Actividad <i>in vitro/in vivo</i> frente a <i>L. amazonensis</i> y <i>L. donovani</i>	(Al-Abdely et al. 1999)

Sulfonamidas

Las sulfonamidas son derivados de las sulfanilamidas y se han usado como agentes terapéuticos durante más de 50 años. Está descrito su amplio espectro de acción sobre diferentes microorganismos desde bacterias, parásitos y hongos, además son potentes inhibidores de células cancerígenas e incluso de algunos virus humanos (Henry 1943). Se ha comprobado que diversos derivados de sulfonamidas son potenciales antiparasitarios frente a la malaria (Ekoue-Kovi et al. 2009; Salahuddin et al. 2013), coccidiosis (Fitzgerald 1975; Navia 2000), schistosomiosis (Fathalla et al. 2003), tripanosomiosis africana (George et al. 2007), Chagas (Pan et al. 2013), toxoplasmosis (Ma et al. 2010) y leishmaniosis, entre otras. En los últimos años, diversos estudios han demostrado la actividad antiparasitaria de diferentes sulfonamidas frente a las distintas especies del género *Leishmania* (Tabla 7).

Tabla 7. Derivados de sulfonamidas con actividad leishmanicida; promastigotes (PR) y amastigotes (AM); No determinado (Nd).

COMPUESTO	MECANISMO DE ACCIÓN	ACTIVIDAD LEISHMANICIDA	REFERENCIA
Dinitroanilina sulfonamida	Inhibidor de la tubulina	AM de <i>L. donovani</i>	(Bhattacharya et al. 2002)
Derivados de las Sulfonamidas	Inhibidor de la tripanotion-reductasa	AM de <i>L. donovani</i>	(Chibale et al. 2001)
Sulfonamida 4-metoxichalconas	Nd	PR y AM de <i>L. braziliensis</i>	(Andrighetti-Fröhner et al. 2009)
N1-fenil-3,5-dinitro-N4,N4-di-n-propil sulfanilamida	Actividad Antimicrotubulos	AM de <i>L. donovani</i>	(Werbovetz et al. 2003; Bhattacharya et al. 2004)
p-nitrobenzeno sulfonamidas	Actividad nucleasa	<i>In vitro/in vivo</i> en BALB/c infectados con <i>L. infantum</i>	(Dea-Ayuela et al. 2009)
N-quinolin-8-il-arylsulfonamidas; 2,5-dicloro benceno sulfonamida	Nd	PR y AM de <i>L. braziliensis</i>	(Everson da Silva et al. 2010)
4-(1H-pirazol-1-il) benceno sulfonamida derivados	Nd	PR de <i>L. infantum</i> y <i>L. amazonensis</i>	(Marra et al. 2012)
(Mn) complejos de sulfadiazina	Nd	AM de <i>L. donovani</i>	(Ajibade et al. 2007)
Sulfonamidoanilinas (oryzalina); Dinitroanilina	Inhibición selectiva de la polimerización de la tubulina	Varias especies de <i>Leishmania</i>	(Mitra & Sept 2006; Ma et al. 2010)

OXOISOAPORFINAS

Las oxoisoaporfinas son alcaloides isoquinolínicos que inicialmente fueron aisladas de la planta trepadora *Menispermum dauricum* DC (*Menispermaceae*) y otras plantas de la misma familia. Sus raíces han sido utilizadas en la medicina tradicional como analgésicos, antipiréticos, frente a la disentería y en la artralgia

reumática, razones por los que ha sido incluida oficialmente en la Farmacopea China (Zhang et al. 2004).

Entre las propiedades biológicas de las oxoisoaporfinas, se ha descrito que tienen actividad antiinflamatoria, inhibición de la agregación plaquetaria (Tong & Yue 1988), son antitumorales (Yu et al. 2001), con actividad dopaminérgica a nivel del sistema nervioso central, efectos cardiológicos y hemodinámicos (Yu et al. 2002). Otros derivados de síntesis química son inhibidores de la acetilcolinesterasa (Tang et al. 2012).

Entre las propiedades antiparasitarias, los derivados sintéticos de las oxoisoaporfinas han demostrado su eficacia en modelos *in vitro* frente a *Plasmodium* y *Giardia* (González-Díaz et al. 2011). Otros estudios identifican el potencial antiparasitario de la O-metilmoscatolina y liriodenina, aislados a partir de *Annona foetida* (Annonaceae), con considerable actividad anti-*Leishmania* en el modelo *in vitro* frente a promastigotes de *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (Costa et al. 2006). Por otro lado, la bioactividad de las fracciones de alcaloides de plantas y arbustos provenientes de África, como *Stephania dinklagei*, que contienen oxoaporfinas (Dicentrinona) y derivados como la N-Metilliriodendronina, 2-O,N-Diimetilliriodendronina y Liriodenina, mostraron actividad leishmanicida frente a promastigotes de *L. donovani* (del Rayo Camacho et al. 2000).

MÉTODOS DE CRIBADO FARMACOLÓGICO

MODELOS IN VITRO.

El cribado *in vitro* es la herramienta más extendida, por la simplicidad de los cultivos de las formas promastigotes y amastigotes axénicos, existiendo diversas metodologías. Este sistema permite la interacción directa del fármaco con el parásito. A pesar de su limitación en relación a los modelos *in vivo*, suponen una herramienta muy valiosa en los cribados de alto rendimiento, porque no es

necesaria la utilización de animales de experimentación y los resultados son altamente consistentes (Serenio et al. 2007; Gupta 2011).

El recuento del número de promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares se ha considerado como el “*gold standar*” para la cuantificación de parásitos viables, después del tratamiento con fármacos, en comparación con aquellos no tratados. Sin embargo, su utilidad se ve reducida cuando se requiere la valoración de muchos compuestos. Por ello se han incorporado técnicas colorimétricas y fluorimétricas basadas en la reducción enzimática de sustratos, que permiten la cuantificación automatizada del número de parásitos viables en el medio.

Métodos colorimétricos

Son ensayos en microplacas de titulación basados principalmente en la reducción enzimática de diversos componentes del medio de cultivo por los parásitos viables, de forma que el cambio de color observado en el medio puede ser medido por espectrometría.

- 1) *MTT*, se fundamenta en la reducción de la sal de bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico en cristales de formazán (que deben solubilizarse en DMSO) por el metabolismo mitocondrial del parásito, principalmente a nivel de la cadena respiratoria, en el transporte de electrones, por acción enzimática de las deshidrogenasas. Se usa frecuentemente para los ensayos de proliferación, viabilidad y citotoxicidad celular (Liu et al. 1997; Dutta et al. 2005). En *Leishmania* es útil en el cribado farmacológico de formas promastigotes y amastigotes axénicos (Serenio et al. 1998; Ganguly et al. 2006).
- 2) *XTT*, es una alternativa al MTT que se fundamenta en la reducción del sodium-2.3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide en combinación con PMS (Fenasinmetosulfato), que acelera el proceso. Se producen sales de formazán a nivel del metabolismo

mitocondrial, pero que son solubles en medio acuoso. También es utilizado para los ensayos de proliferación, viabilidad y citotoxicidad celular (Roehm et al. 1991; Williams et al. 2003).

- 3) *p-Nitro Fenil Fosfato*, es un sustrato incoloro que es reducido por la acción enzimática de las fosfatasas. El grupo fosfato unido al sustrato es reconocido por la enzima y cuando es solubilizado o hidrolizado lo reduce a *p*-nitrofenol que presenta una coloración amarillenta en medio alcalino, medible a una longitud de onda de 405 nm. Este método permite la evaluación sobre las formas promastigotes y amastigotes intracelulares (Bodley et al. 1995; Carrio et al. 2001).

Métodos fluorimétricos

Son mucho más sensibles que los métodos colorimétricos porque tienen la capacidad de discriminar señales de ruido ajenas a la actividad celular del parásito. Estos métodos se basan en procesos enzimáticos, de unión al ADN o por la cuantificación de proteínas específicas de parásitos transfectados (Serenio et al. 2007).

- 1) *La resazurina*, es un compuesto de color azul que por acción de enzimas reductoras como las flavinmononucleotido-dehidrogenasa, flavin adenina dinucleotidodehidrogenasa y nicotinamidaadenina-dehidrogenasa, a nivel de la mitocondria y la cadena respiratoria del parásito o célula, se reducen en un sustrato denominado resorufina, de color rosáceo intenso y que emite fluorescencia a 579/584 nm de excitación/emisión. Se usa ampliamente en ensayos de viabilidad celular y selección de compuestos con promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania* (Czekanska 2011).
- 2) *SybrGreen*, es un fluoroforo que tiene la capacidad de intercalarse en la doble cadena de ADN y emitir fluorescencia a una longitud de onda de 497/520 nm de excitación/emisión. La intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de ADN total. Se utiliza en el cribado *in vitro* frente a *Plasmodium* (Johnson et al. 2007), *Giardia intestinalis*

y *Entamoeba histolytica* (Downey et al. 2009). Sin embargo, no se ha descrito su uso en el cribado frente a *Leishmania*.

- 3) *Parásitos transfectados*. Se basan en el uso de genes reporteros como la luciferasa de luciérnaga (Lang et al. 2005), β -galactosidasa (Okuno et al. 2003), el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) (Singh et al. 2009), o el cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (Rocha & Horizonte 2013). Se pueden utilizar tanto en sistemas de microplacas como en citometría de flujo. Son especialmente útiles para la selección de compuestos sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania*.

MODELOS IN VIVO.

Se han desarrollado muchos modelos experimentales de leishmaniosis, estos incluyen la utilización de animales de experimentación como cobayas, conejos, perros, monos, ratones y en el criceto (Tabla 8) (Hommel et al. 1995).

Tabla 8. Patrón de enfermedad-infección esperada en estirpes de ratones consanguíneos y cricetos infectados con especies de *Leishmania* de localizaciones cutáneas o viscerales (Sacks & Melby 2001).

Hospedador	<i>L. major</i> ^a	<i>L. mexicana</i> ^a	<i>L. braziliensis</i> ^a	<i>L. donovani</i> ^b
BALB/c	Progresivo	Progresivo	Sin Lesión	Susceptibilidad aguda/sin cura
DBA1	Crónico	ND	ND	Susceptibilidad aguda
DBA2	Crónico	Sin Lesión	ND	Resistencia aguda
CBA	Curación	ND	ND	Resistencia aguda
C3H	Curación	Crónico	ND	Resistencia aguda
A/J	Curación	Curación	ND	Resistencia aguda
AKR	Curación	ND	ND	Resistencia aguda
NZB	Curación	ND	ND	Resistencia aguda
C57BL	Curación	Crónico	ND	Susceptibilidad aguda/cura
Criceto	Crónico	Crónico	Crónico	Progresivo

a = infección subcutánea o intradérmica con 10^4 a 10^7 parásitos; b = infección intravenosa con 10^7 parásitos; ND = no determinado.

Estos modelos son atractivos porque permiten controlar los aspectos genéticos del parásito y del hospedador, sin embargo, no reproducen con exactitud la enfermedad en humanos. Los patrones de las enfermedades producidas en los animales de laboratorio difieren ampliamente según la especie, la estirpe en el caso de los ratones y la especie de *Leishmania* utilizadas, de forma que ciertas especies animales pueden llegar a ser refractarios o presentar una susceptibilidad letal y aguda (Handman 2001; Sacks & Melby 2001).

Leishmaniosis cutánea en el modelo murino

Los modelos de leishmaniosis cutánea en ratones consanguíneos genéticamente susceptibles o resistentes, son ampliamente utilizados para la búsqueda de nuevos fármacos leishmanicidas.

Para la infección, la parte del cuerpo más utilizada en este modelo es la pata trasera izquierda o derecha del ratón. Las ventajas de este modelo, son el desarrollo de la lesión en la almohadilla plantar que puede ser evaluada mediante la medición continua del proceso inflamatorio, sin necesidad de sacrificar al animal (Sacks & Melby 2001).

Los ratones BALB/c son muy susceptibles a la leishmaniosis cutánea experimental, desarrollando un proceso inflamatorio y ulceroso creciente, que puede expandirse e incluso llegar a metastatizar (Alexander & Phillips 1978; Alexander & Kaye 1985). La infección experimental con *L. amazonensis* produce lesiones menos ulcerativas, en comparación con *L. major* en ratones BALB/c, que en algunos casos llegan a controlar ligeramente la infección, aunque son incapaces de curarse por sí mismos y pueden metastatizar a sitios distales (Perez et al. 1979; Barral et al. 1983). Por el contrario, la infección por *L. major* o *L. mexicana* en ratones C57/BL6 y CBA/n son menos probables porque son resistentes, rara vez desarrollan pequeñas lesiones que se curan entre 10 y 12 semanas, siendo resistentes a la re-infección y con desarrollo de respuestas inmune humoral y de hipersensibilidad tardía (Perez et al. 1979; Trotter et al.

1980). También se ha determinado que las infecciones experimentales con las especies del subgénero *L. (Viannia)*, en el modelo murino, no son idóneos para la investigación en la búsqueda de fármacos leishmanicidas (Rey et al. 1990).

Leishmaniosis visceral en los modelos murino y en criceto

La leishmaniosis visceral se puede estudiar en los modelos de infección en ratones o criceto. Se ha visto que distintas cepas de *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. infantum* infectan al criceto, induciendo una forma de leishmaniosis visceral que progresa hacia la muerte del animal (Hommel et al. 1995). Los ratones BALB/c presentan una susceptibilidad inicial a la infección, sin embargo después de varias semanas, pueden controlar la carga parasitaria, manteniendo un nivel bajo de infección crónica ((Wilson et al. 1996; Murray 2001; Mukherjee et al. 2003).

La infección en ambos modelos es por vía sistémica, pudiendo ser intravenosa, intracardiaca o intraperitoneal. La vía de inoculación de los parásitos es la principal limitante en el modelo murino, porque se dificulta el patrón de reproducibilidad en la colonización del hígado y bazo. Además se requieren grandes cantidades de parásitos y en el caso del uso de ratones otro inconveniente es que con el transcurso del tiempo, se disminuye la carga parasitaria hasta niveles indetectables, aunque los ratones no llegan a morir (Leclercq et al. 1996; Engwerda et al. 1998). En cambio los cricetos consanguíneos proporcionan un modelo de infección visceral progresiva que imita en gran medida a la leishmaniosis visceral humana (Sacks & Melby 2001).

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En Bolivia, más del 50% de los casos de las leishmaniosis están distribuidas en la región de los valles sub-andinos del Departamento de La Paz (Fuente: “*Programa nacional de vigilancia y control de la leishmaniosis*”, Bolivia) <http://www.sns.gob.bo/documentacion/doc-epidemiologia/LEISHMANIASIS.pdf>.

Entre las causas más importantes, está el incremento de migrantes denominados “*colonos*” desde el altiplano hacia estas regiones donde *Leishmania* es endémica, lo que ha incidido directamente en un aumento del número de casos de leishmaniosis con grave impacto en la persistencia de la enfermedad. Sin embargo, no se conoce con exactitud cuáles son las especies de *Leishmania* circulantes en esta zona, por tanto, la identificación y caracterización de éstas, es de suma relevancia para la vigilancia y control de esta enfermedad.

En este trabajo se han combinado diferentes marcadores y métodos moleculares para caracterizar aislados autóctonos de *Leishmania* obtenidos de lesiones cutáneas y mucocutáneas de pacientes bolivianos con el objetivo de identificar las especies de *Leishmania* circulantes en la región subandina del Departamento de La Paz (Bolivia).

1. Determinación de la utilidad de la secuenciación de una región parcial del gen que codifica el citocromo b para identificar las especies circulantes y reconstruir las relaciones filogenéticas de los aislados autóctonos de *Leishmania*.
2. Evaluación de la utilidad de la PCR-RFLP de los marcadores moleculares ITS-1, HSP70-I y citocromo b en la identificación de especies de *Leishmania*.
3. Demarcar la distribución geografía de las distintas especies de *Leishmania*, previamente identificadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

REACTIVOS GENERALES

Tampón TAE 50X, pH 8

Tris Base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0.5M	100 mL
H ₂ O dd	c.s.p 1000 ml

Tampón de muestra

Azul de bromofenol	0,25 g
Sacarosa	40 g
H ₂ O dd	c.s.p 100 ml

Preparación del gel de agarosa

Concentración	2%	3%
Agarosa	2 g	3 g
TAE (1X)	100mL	100mL

Medio de cultivo Schneider, pH 6,7

Schneider's Insect Medium	24,5 g
NaHCO ₃	0,4 g
HEPES	4,0 g
SBF	0,1 L
Penicilina	0,1 g
Estreptomicina	0.1 g
H ₂ O dd	c.s.p 1000 ml

Filtrar a través de filtros de 0,22 µm, para esterilización.

AISLADOS DE *LEISHMANIA*

En este trabajo se han analizado 55 aislados de *Leishmania*, previamente obtenidos de pacientes con leishmaniosis cutánea y mucocutánea. Los aislados proceden del Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) de La Paz (Bolivia), y fueron cedidos gentilmente por el Dr. José Santalla para este estudio. Además, se incluyeron en el estudio las siguientes cepas de referencia: *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN83) cedida por la Dra. M. Portús de la Universidad de Barcelona; *L. amazonensis* (MHOH/BR/79/MARIA), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. guyanensis* (141/93), cedidas por el Dr. A. Toraño del Instituto de Salud Carlos III de Madrid y *L. mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21), cedida por el Dr. M. Sánchez Moreno de la Universidad de Granada.

El origen de los aislados y los datos epidemiológicos se reflejan en la Tabla 9.

Tabla 9. Aislados de *Leishmania* de pacientes provenientes del Departamento de La Paz (2009 – 2010).

CÓDIGO	PACIENTE		PROCEDENCIA		TIPO DE LESIÓN
	Género	Edad ^a	Provincia	Municipio	
INL-001-10	M	38	Caranavi	Caranavi	LC
INL-002-10	M	43	Nor Yungas	Coripata	LC
INL-011-10	F	45	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-012-10	F	77	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-051-10	F	40	Nor Yungas	Coripata	LC
INL-065-10	M	11	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-097-10	M	25	Larecaja	Sorata	LC
INL-153-09	M	7m	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-213-10	F	50	Sud Yungas	Chulumani	LC
INL-255-10	M	63	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-264-10	M	22	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-296-10	F	4	Nor Yungas	Coroico	LC
INL-297-09	M	7	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-298-09	F	14	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-329-10	M	37	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-366-10	M	30	F. Tamayo	Apolo	LC
INL-367-10	F	45	Chaparé ^b	Villa Tunari	LC
INL-371-10	M	61	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-377-10	M	45	Inquisivi	Cajuata	LC

INL-386-10	F	37	F. Tamayo	Apolo	LC
INL-396-10	F	20	Muñecas	Camata	LC
INL-412-10	M	30	Muñecas	Puente Villa	LC
INL-413-10	F	17	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-414-10	M	76	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-415-10	F	36	Sud Yungas	Chulumani	LC
INL-435-10	F	13	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-436-10	F	20	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-448-10	F	14	Sud Yungas	Chulumani	LC
INL-452-10	M	12	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-459-10	F	24	Larecaja	Chuquini	LC
INL-464-10	M	57	Caranavi	Caranavi	LC
INL-465-10	F	3	Inquisivi	Cajuata	LCD
INL-466-10	F	40	Inquisivi	Cajuata	LMC
INL-471-10	F	2	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-474-10	F	9	Nor Yungas	Coripata	LC
INL-480-10	F	23	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-481-10	M	39	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-483-09	F	9	Sud Yungas	Chulumani	LC
INL-484-10	M	30	Sud Yungas	Palos Blancos	LC
INL-485-10	M	6	Sud Yungas	Chulumani	LC
INL-503-10	M	71	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-505-10	M	19	F. Tamayo	Apolo	LC
INL-518-10	M	20	Inquisivi	Inquisivi	LC-LMC
INL-522-10	F	20	Murillo	La Paz	LC
INL-524-10	M	7	Nor Yungas	NNN	LC
INL-540-10	M	23	Perú ^d	Perú	LC
INL-554-10	M	41	Sud Yungas	La Asunta	LC
INL-560-10	M	10	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-582-10	F	30	Sud Yungas	Irupana	LC
INL-606-10	M	46	Nor Yungas	Coripata	LC
INL-626-10	M	27	Murillo	El Alto	LMC
INL-638-10	M	62	Inquisivi	Cajuata	LC
INL-FLA-09	M	25	Vaca Díez ^c	Riberalta	LC
INL-JTD-09	M	17	Vaca Díez ^c	Riberalta	LC
IIFB-AS-10	M	NN	Sud Yungas	La Asunta	LC

M = Masculino; F = Femenino; a = Edad en años; b = Departamento de Cochabamba; c = Departamento de Beni; d = Pacientes del Perú; LC = Leishmaniosis cutánea; LMC = Leishmaniosis mucocutánea; LCD = Leishmaniosis cutánea difusa.

PROCEDIMIENTOS

CULTIVO DE LOS PARÁSITOS

Todos los aislados fueron cultivados en 20 mL de medio Schneider, incubados a 26°C, en frascos de cultivo y mantenidos mediante pases periódicos cada 7 días.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico de cada aislado se obtuvo mediante la extracción con el kit de *Quiagen DNeasy Blood & Tissue* (Nº 69504), siguiendo las instrucciones del fabricante con unas mínimas variaciones.

- Se preparó un cultivo en masa de promastigotes en fase estacionaria y se alicuotaron pellets de $2,5 \times 10^7$ promastigotes, que se centrifugaron a 2500 g/5 minutos/4°C. Tras decantar el sobrenadante se le añadió al pellet 1 mL de PBS, previamente filtrado a través de membranas millipore de 0,22 µm (este procedimiento se realizó dos veces más), y finalmente se desechó el sobrenadante. Al pellet se le añadieron 200 µL de PBS, 20 µL de proteinasa K y 200 µL de Buffer AL (sal caotrópica de hidrocloreuro de guanidina). Se agitó vigorosamente y se incubó a 56°C/1 hora (con el fin de lisar las células y liberar el ADN del parásito).
- Después se añadieron 200 µL de etanol-isopropanol 1:1, mezclándose vigorosamente para la formación de enlaces iónicos que precipitan el ADN.
- La mezcla se trasvasó a una columna *Dneasy mini spin* (que está incorporada a un tubo colector) y se centrifugó a 6000 g/1 minuto (la membrana de la columna fija selectivamente el ADN y la fuerza centrífuga elimina los restos celulares, proteínas y metabolitos).

- Se recuperó la columna *DNeasy mini spin* y se incorporó a un nuevo tubo colector. A la columna se le añadieron 500 µL de buffer AW1 (sal caotrópica de hidrocloreuro de guanidina y etanol) y se centrifugó a 6000 g/1 minuto (para eliminar contaminantes e inhibidores enzimáticos).
- Nuevamente se recogió la columna *DNeasy mini spin* y se incorporó en un nuevo tubo colector. A la columna se le añadieron 500 µL de buffer AW2 (conservante azida sódica y etanol), se centrifugó a 20000 g/3 minutos. Se repitió la centrifugación a 20000 g/1 minuto en otro tubo colector (para garantizar la eliminación de residuos de etanol que podrían interferir las reacciones posteriores).
- Finalmente, la columna *DNeasy mini spin* se volvió a incorporar a un nuevo tubo colector. Se le añadieron 200 µL de H₂O mili-Q que se centrifugó a 6000 g/1 minuto y se recogió el eluido conteniendo el ADN genómico.

La concentración de ADN se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm en relación a un blanco, teniendo en cuenta que una absorbancia de 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de ADN bicatenario.

El grado de pureza del ADN se determinó calculando la relación entre las absorbancias a 260nm y 280nm (un ratio de alta pureza está comprendido entre 1,8 y 2).

IDENTIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS-1 MEDIANTE PCR-RFLP

PCR ITS-1

Se ha seguido el protocolo descrito por el Tai y colaboradores (2000), previa adaptación a las condiciones de nuestro laboratorio. La mezcla de reacción se indica en el siguiente protocolo:

Componentes	Volumen de reacción (25 µL)
Amplitaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems®)	12,5 µL
Primer LITSR 10mM (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3')	1,5 µL
Primer L5.8S 10mM (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3')	1,5 µL
ADN 0,5 µg/mL	2,0 µL
H₂O mili-Q	5,5 µL

Las condiciones de la PCR fueron programadas en un termociclador (Mastercycler gradient Eppendorf®), de la siguiente manera:

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización inicial	96º	10 min	
Desnaturalización	96º	1 min	35
Alineación	53º	1 min	
Extensión	72º	3 min	
Extensión final	72º	10 min	

RFLP-ITS-1

Siguiendo los protocolos descritos por el fabricante (*Sigma-aldrich*), la digestión enzimática fue preparada para un volumen final de 10 µL:

✓ Producto de la PCR-ITS-1	5,0 µL
✓ H ₂ O mili-Q	3,8 µL
✓ Tampón del enzima 10X	1,0 µL
✓ Enzima de restricción <i>Hae-III</i>	0,2 µL

La mezcla se incubó a 37ºC durante 2 horas, elevándose la temperatura posteriormente a 80ºC, durante 20 minutos, para inactivar la enzima.

Electroforesis en gel de agarosa ITS-1

El gel de agarosa de alta resolución fue preparado al 3% en tampón TAE 1X. En cada pocillo del gel se depositaron 10 µL de muestra, mezclados con 10% de tampón de muestra. La electroforesis se realizó a 50 V, a temperatura ambiente, en una cubeta RunOne™ System, durante 90 minutos.

El gel se dejó sumergido en 0,5% de BrEt (bromuro de etidio) durante 15 minutos. Finalmente, las bandas electroforéticas fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV Uvidoc H2D LCD Uvitec®.

IDENTIFICACIÓN DE HSP70-I MEDIANTE PCR-RFLP

PCR HSP70-I

Se ha seguido el protocolo descrito por García y colaboradores (2004) con algunas modificaciones. La composición de la mezcla fue la siguiente:

Componentes	Volumen de reacción (25 µL)
Amplitaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems®)	12,5 µL
Primer Hsp70sen 10µM (5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA-3')	1,0 µL
Primer Hsp70ant 10µM (5'-CCGCCATGCTCTGGTACATC-3')	1,0 µL
ADN 0,5 µg/mL	2,0 µL
H ₂ O mili-Q	8,5 µL

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización inicial	96º	10 min	35
Desnaturalización	96º	1 min	
Alineación	50º	1,5 min	
Extensión	72º	3 min	
Extensión final	72º	10 min	

Concentración del producto de PCR

El producto de amplificación por la PCR-HSP70 fue concentrado siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (2001).

1. Al producto de la PCR (10 µL) se añadieron 20 µL de H₂O mili-Q, 3 µL de acetato de sodio (3M pH 5,4) y 66 µL de etanol absoluto. Se mezcló vigorosamente y se refrigeró a -20°C durante 30min.
2. Posteriormente se centrifugó a 12.000 g/10min/4°C y se decantó todo el sobrenadante.
3. Al pellet se le añadieron 200 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 12.000 g/2min/4°C. A continuación se decantó todo el sobrenadante y se secó a 37°C, durante 30 minutos, para eliminar las trazas de etanol.
4. Finalmente el pellet fue resuspendido en 10 µL de H₂O mili-Q y se conservó a 4°C o a -20°C para largos periodos de conservación.

RFLP-HSP70-I

De acuerdo con lo descrito por García y colaboradores (2004), y siguiendo las instrucciones del fabricante (*Sigma-aldrich*), la mezcla de reacción para un volumen final de 20 µL fue:

✓ Producto de la PCR-HSP70	10,0 µL
✓ H ₂ O mili-Q	7,8 µL
✓ Tampón del enzima 10X	2,0 µL
✓ Enzima de restricción <i>Hae-III</i>	0,2 µL

La mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas, elevándose la temperatura posteriormente a 80°C, durante 20 minutos, para inactivar la enzima de restricción.

Al igual que en la RFLP-ITS-1, el análisis de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%.

IDENTIFICACIÓN DEL CITOCROMO B MEDIANTE PCR-RFLP Y SECUENCIACIÓN

PCR CIT-B

Se ha seguido el protocolo descrito por Luyo-Acero y colaboradores (2004) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción fue preparada para un volumen final de 25 μ L fue:

Componentes	Volumen de reacción (25 μ L)
Amplitaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems®)	12,5 μ L
Primer LCBF1 10μM (5'GGTGTAGGTTTGTAGTTAGG3')	1,0 μ L
Primer LCBR2 10μM (5'CTACAATAAACAAATCATAATATACAATT3')	1,0 μ L
ADN 0,5 μg/mL	1,0 μ L
H₂O mili-Q	9,5 μ L

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización inicial	96º	10 min	35
Desnaturalización	96º	1 min	
Alineación	50º	1,5 min	
Extensión	72º	1,5 min	
Extensión final	72º	10 min	

RFLP-CIT-B

Siguiendo las indicaciones del fabricante (*Thermo Scientific Fermentas*), la digestión enzimática se preparó para un volumen final de 10 μ L:

✓ Producto de la PCR-CYTB	5,0 μ L
✓ H ₂ O mili-Q	3,8 μ L
✓ Tampón del enzima 10X	1,0 μ L
✓ Enzima de restricción <i>Ase-I</i>	0,2 μ L

La mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas, elevándose la temperatura posteriormente a 65°C, durante 20 minutos, para inactivar la enzima de restricción.

El análisis de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%.

Secuenciación de los productos de PCR-CITB

Los productos de la PCR fueron purificados siguiendo las condiciones del fabricante (*qiaquick amp Qiagen*). 5 µL de cada producto de PCR (~20 ng/µL) de los 55 aislados y de las cepas de referencia de *Leishmania*, junto con los correspondientes primers LCBF1 y LCBR2 (5 µM), fueron enviados a la Unidad de Genómica del Parque Científico de la Universidad Complutense de Madrid, donde se realizó la secuenciación en un secuenciador automático ABI-Prism 3730.

Análisis informático y alineamiento global de las secuencias

Los cromatogramas de todas las secuencias parciales de los productos del cit-b amplificados de cada cepa, fueron visualizados y analizados con el programa *Chromas 2.31* (McCarthy 1998). Durante la edición se recortaron los extremos de las secuencias con gran número de indeterminaciones y se realizó el alineamiento local de los pares de secuencias 3'-5' y 5'-3' de cada cepa para obtener sus secuencias consenso con el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall 2007). Estas secuencias consenso fueron comparadas con secuencias previamente publicadas por otros autores en la base de datos del NCBI-NIH, mediante BLASTn (nucleotide *Basic Local Alignment Search Tool*).

Análisis filogenético de las secuencias

Con el programa Mega v.5.2.1, opción Clustal-W 1.6 (Tamura et al. 2011) se realizó el alineamiento global de las 55 secuencias del cit-b, junto a las secuencias conocidas de este gen de distintas especies del género *Leishmania*,

obtenidas de la base de datos NCBI-nucleotide: (1) *L. braziliensis* (AB095966.1; AB095967.1 y AB434682.1), (2) *L. panamensis* (EF579901.1), (3) *L. guyanensis* (EF579905.1), (4) *L. lainsoni* (AB433280.1), (5) *L. shawi* (AB434680.1), (6) *L. naiffi* (AB433279.1), (7) *L. amazonensis* (AB095964.1; EF579909.1; EF579902.1; HM439238.1), (8) *L. mexicana* (EF579906.1; AB095963.1; AB558229.1; M97357.1 y M92829.1), (9) *L. donovani* (FJ416603.1), (10) *L. chagasi* (AB095959.1), (11) *L. tarentolae* (L07542.1) y la secuencia parcial de (12) *Trypanosoma cruzi* X109/2 (AJ439726.1) como grupo externo. Los parámetros de este alineamiento fueron: matriz de transiciones de ADN de 0,5, límite de divergencia 30%, sanciones GOP 15 “Gap Opening Penalty” y GEP 6.66 “Gap Extension Penalty”.

Se recortaron los extremos para uniformar el tamaño de las secuencias y se construyeron diferentes árboles filogenéticos basados en el cálculo de distancias entre secuencias, utilizando el modelo Kimura 2-parametros: de proximidad (*neighbour joining*) (NJ) (Kimura 1980; Saitou & Nei 1987; Tamura et al. 2011), y mínima evolución (*minimun evolution*) (ME) (Kimura 1980; Saitou & Nei 1987; Rzhetsky & Nei 1992; Tamura et al. 2011). Además se construyeron las redes filogenéticas inferidas de las distancias *p*-no corregidas, por el método de proximidad utilizando el programa *SplitsTree4* (Huson & Bryant 2006). En la construcción de todos los árboles, el soporte de los grupos monofiléticos se determinó por el método “*Bootstrap*” (Felsenstein 1985), utilizando 2.000 pseudoreplicas y el valor de significación estadística para definir los grupos fue del 95% (Efron et al. 1996).

Para identificar las regiones conservadas se ha determinado el umbral de conservación (CT = 0,82) y la longitud mínima de la ventana (MWL = 66), basado en el número de cambios nucleotídicos en la secuencia, utilizando la opción dinámica de parámetros definidos por las secuencias mediante el programa DNASP v5.1 (Librado & Rozas 2009).

RESULTADOS

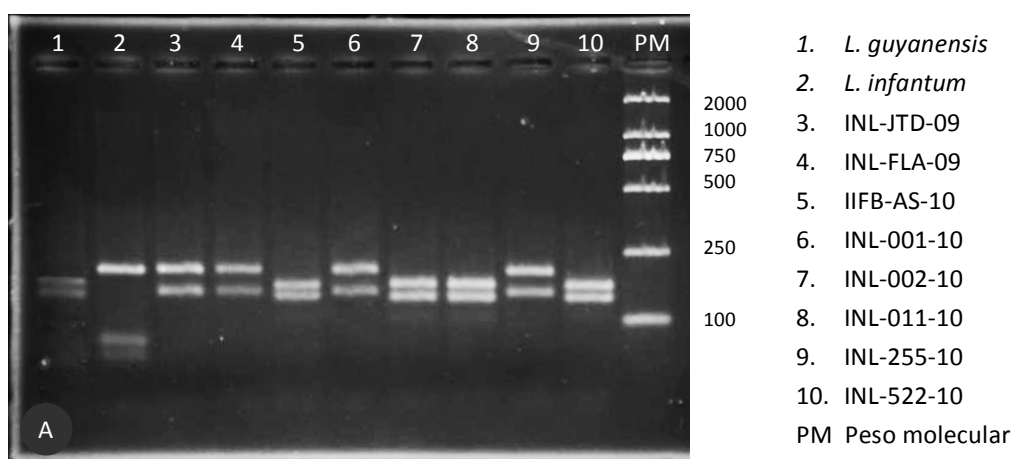
RESULTADOS

El uso de los marcadores moleculares ITS-1, HSP70-I y Cit-b, nos ha permitido llevar a cabo la caracterización de los aislados de *Leishmania* procedentes de lesiones cutáneas y mucocutáneas de pacientes con sospecha clínica de leishmaniosis en Bolivia.

A continuación se describen los resultados obtenidos en la PCR-RFLP de los productos amplificados de ITS1, HSP70-I y cit-b, además de la secuenciación parcial del gen de este último.

IDENTIFICACIÓN POR PCR - RFLP DE ESPACIADORES ITS1

La amplificación del gen ITS1 y posterior digestión enzimática con la endonucleasa de restricción *Hae*-III, permitió la identificación de bandas en el rango de 250-100 pb en las muestras en estudio. Estas bandas fueron comparadas con los perfiles generados por las cepas de referencia, observándose que 40 aislados (72,7%) se correspondían con el perfil generado por *L. (Viannia) braziliensis* y 15 (27,3%) se correspondían con el de *L. (Leishmania) amazonensis* (Fig. 27).

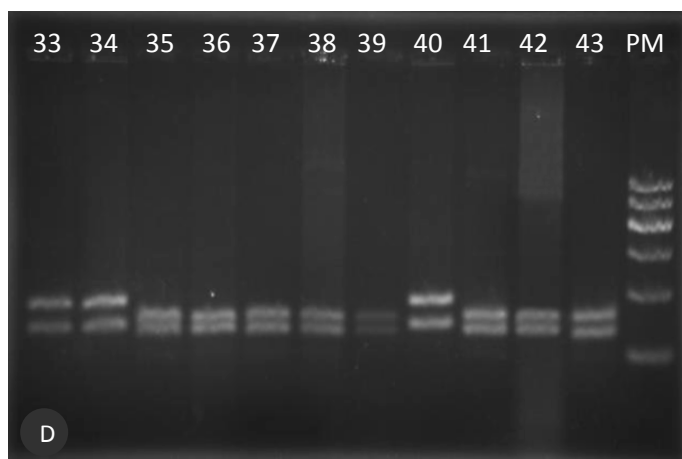




- 11. *L. braziliensis*(M2904)
- 12. *L. braziliensis* (M2903)
- 13. *L. amazonensis* María
- 14. *L. mexicana* (BEL21)
- 15. INL-097-10
- 16. INL-484-10
- 17. INL-485-10
- 18. INL-518-10
- 19. INL-540-10
- 20. INL-415-10
- 21. INL-367-10
- PM Peso molecular



- 22. INL-012-10
- 23. INL-051-10
- 24. INL-065-10
- 25. INL-153-09
- 26. INL-213-10
- 27. INL-264-10
- 28. INL-296-10
- 29. INL-297-09
- 30. INL-298-09
- 31. INL-329-10
- 32. INL-366-10
- PM Peso molecular



- 33. INL-371-10
- 34. INL-377-10
- 35. INL-386-10
- 36. INL-396-09
- 37. INL-412-10
- 38. INL-413-10
- 39. INL-414-10
- 40. INL-435-10
- 41. INL-436-10
- 42. INL-448-10
- 43. INL-452-10
- PM Peso molecular

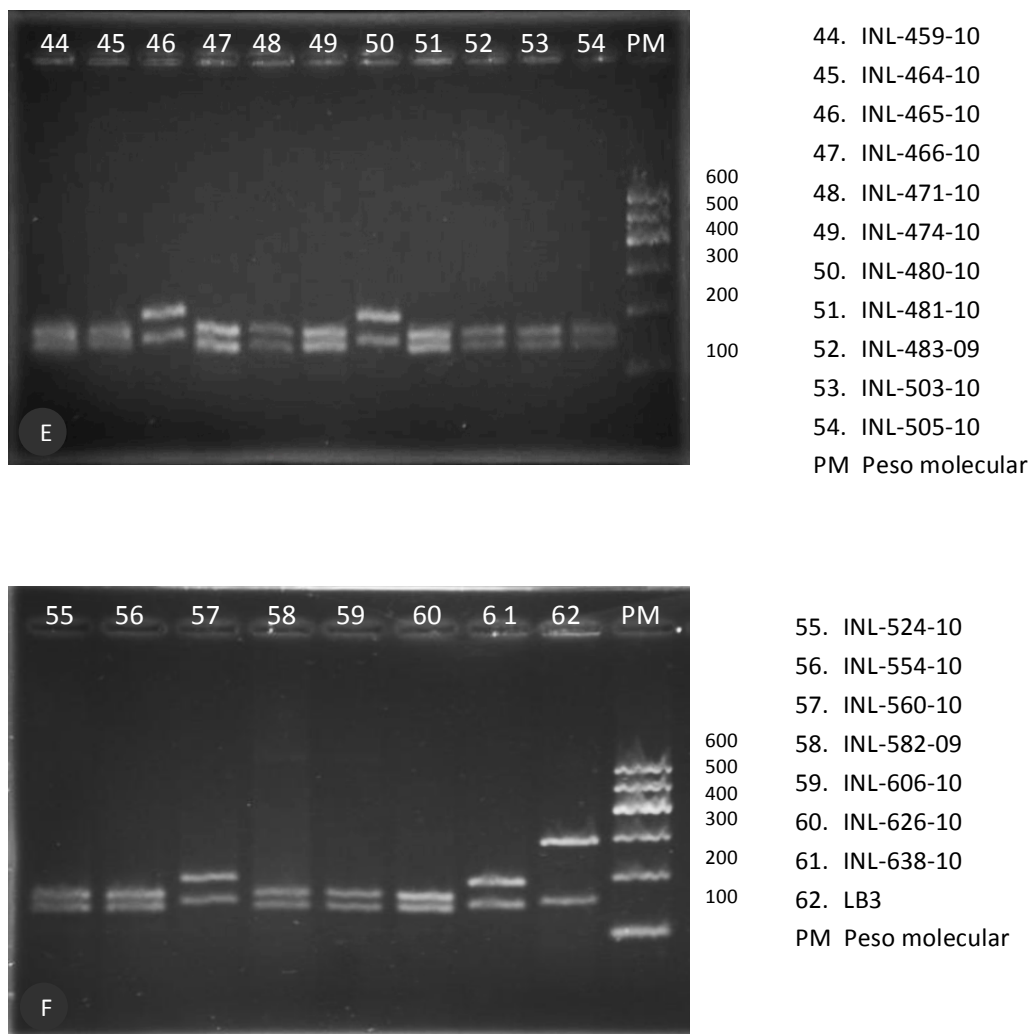
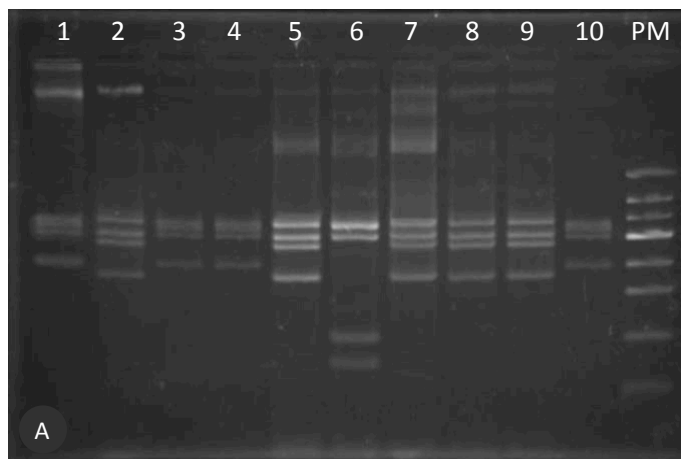


Fig. 27 (A, B,C, D, E y F). Resultados de los perfiles de digestión con la endonucleasa de restricción *Hae*-III de la región interna del ITS1.

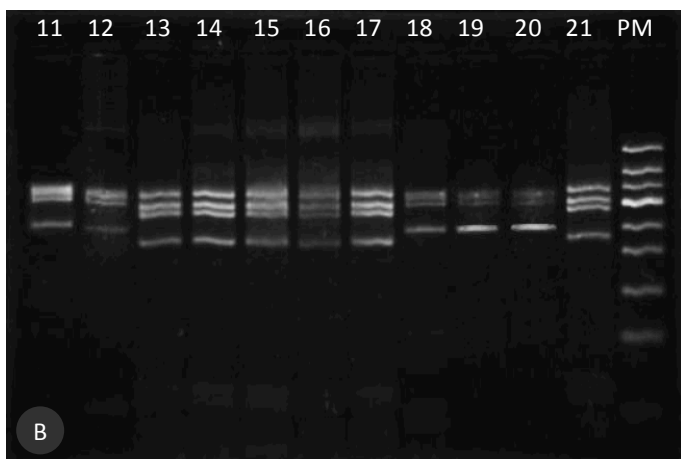
IDENTIFICACIÓN POR PCR - RFLP DE LA REGIÓN DEL GEN HSP70-I

La amplificación del gen de la HSP70-I y posterior digestión enzimática con la endonucleasa de restricción *HAE*-III, permitió la identificación de bandas en el rango de 300-100 pb en las muestras estudiadas. Las bandas observadas fueron comparadas con las cepas de referencia, identificándose que 36 aislados (65,5%) se correspondían con el perfil generado por el complejo *L. (V.) braziliensis* (*L. braziliensis*/*L. peruviana*/*L. naiffi*), 15 aislados (27,3%) se correspondían con el

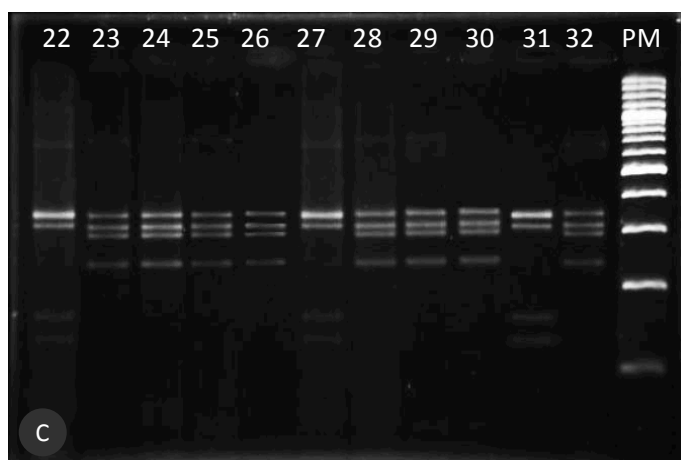
complejo *L. (Leishmania) mexicana* (*L. mexicana*/*L. amazonensis*/*L. garnhami*) y 4 aislados (7,3%) que se correspondían con *L. (V.) lainsoni* (Fig. 28).



1. INL-001.10
2. INL-002.10
3. INL-FLA.09
4. INL-JTD.09
5. INL-011.10
6. INL-296.10
7. INL-012.10
8. INL-051.10
9. INL-065.10
10. INL-097.10
- PM Peso molecular



11. INL-153.09
12. INL-255.10
13. INL-213.10
14. INL-264.10
15. INL-329.10
16. INL-366.10
17. INL-367.10
18. INL-297.09
19. INL-298.09
20. INL-480.10
21. INL-386.10
- PM Peso molecular



22. INL-396.10
23. INL-412.10
24. INL-413.10
25. INL-414.10
26. INL-415.10
27. INL-540.10
28. INL-436.10
29. INL-448.10
30. INL-452.10
31. IIFB-AS.10
32. INL-459.10
- PM Peso molecular

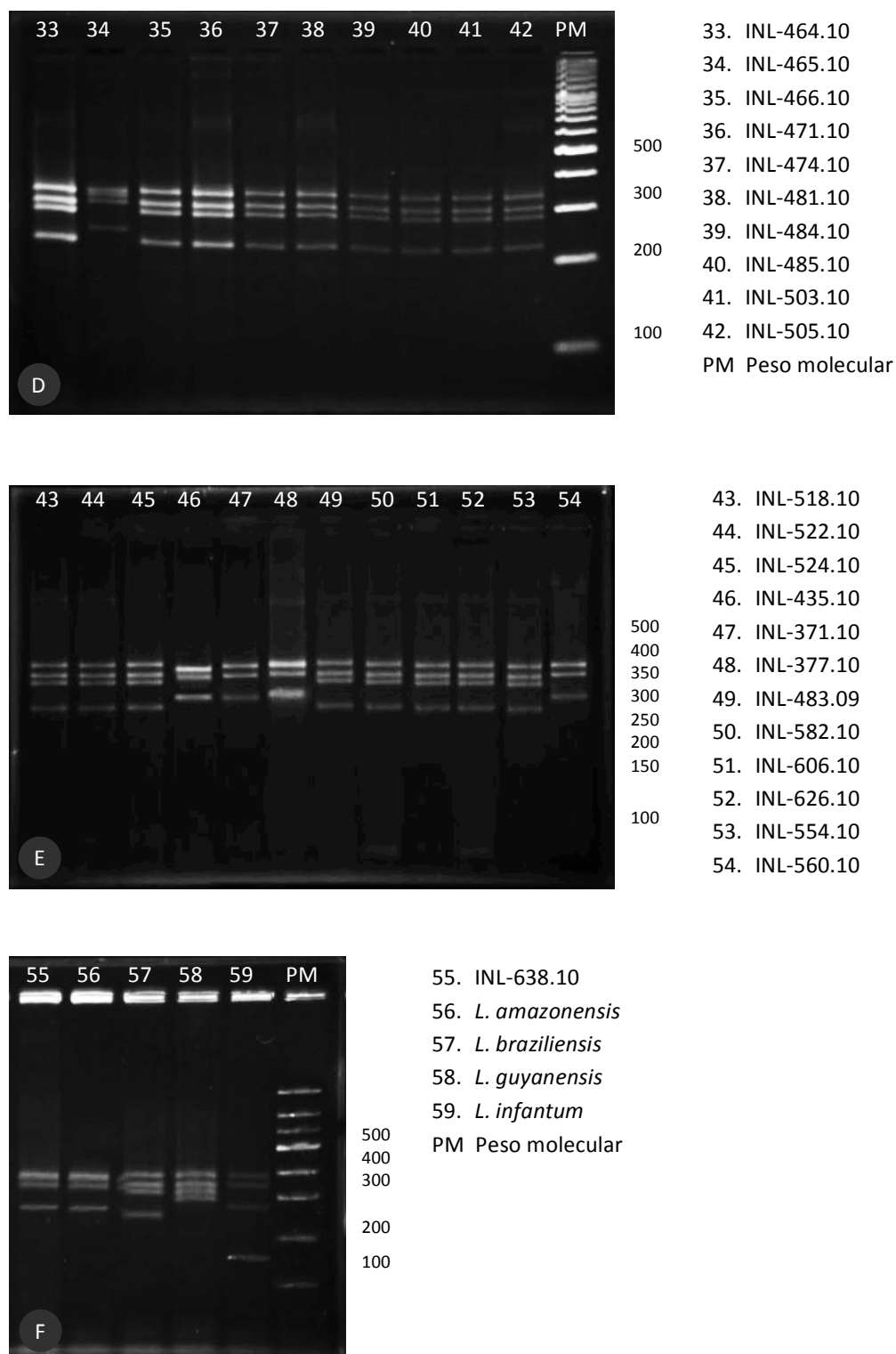


Fig. 28 (A, B, C, D, E y F). Resultados de los perfiles de digestión con la endonucleasa de restricción *Hae*-III del gen de la proteína HSP70-I.

También se realizó la digestión *in silico* de 13 secuencias parciales del gen de la HSP70-I derivadas del banco de genes del NCBI (Genbank) con el software on-line NEBcutter 2 (Fig. 29 y Tabla 10).

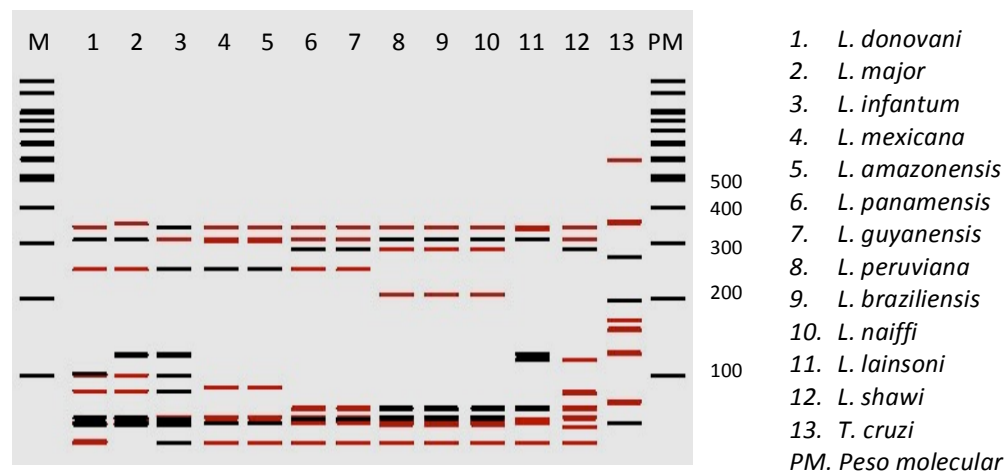


Fig. 29. Perfil *in silico* de los fragmentos obtenidos con la endonucleasa de restricción *Hae*-III del gen de la HSP70-I.

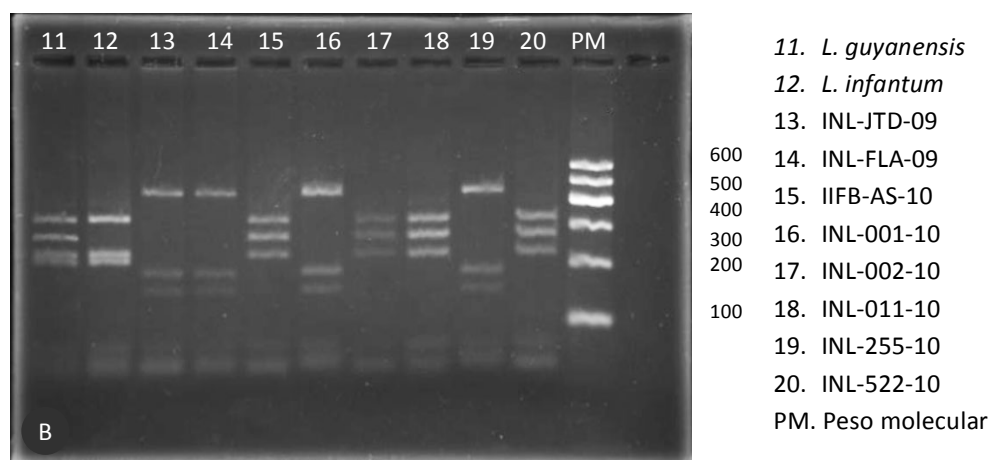
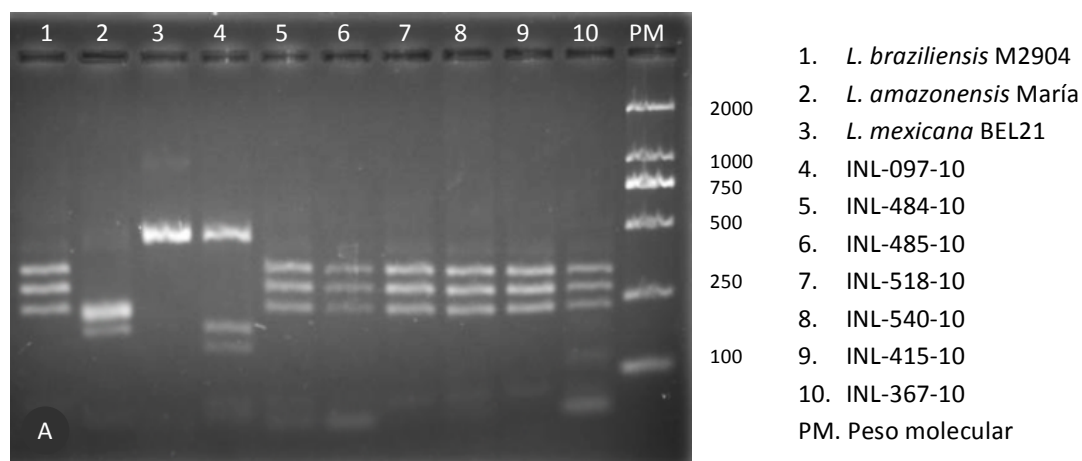
Tabla 10. Fragmentos de restricción de las regiones polimórficas del gen HSP70 de *Leishmania* determinados *in silico* a partir de las secuencias del Genbank del NCBI.

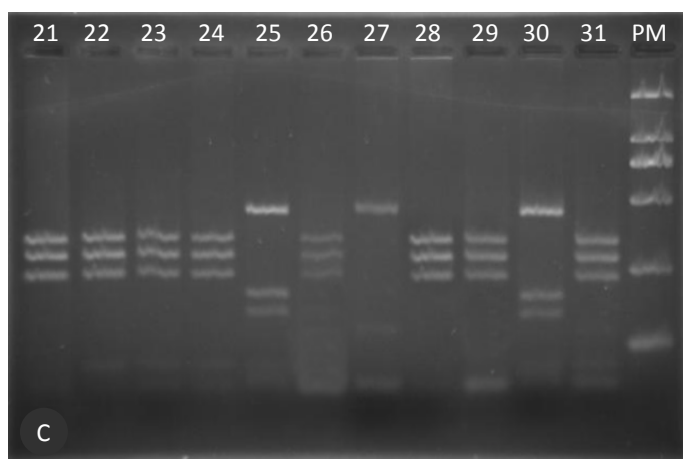
Especie	Sitios de restricción					Número de acceso
<i>L. donovani</i>	338	307	246	102	99	JX021435.1
<i>L. major</i>	351	307	246	125	99	FN395022.1
<i>L. infantum</i>	338	307	246	124	99	JN628986.1
<i>L. mexicana</i>	338	307	304	246	85	FN395038.1
<i>L. amazonensis</i>	338	307	304	246	85	EU599090.1
<i>L. panamensis</i>	338	307	286	245	59	EU599094.1
<i>L. guyanensis</i>	338	307	286	245	59	EU599093.1
<i>L. peruviana</i>	338	307	286	205	59	EU599089.1
<i>L. braziliensis</i>	338	307	286	205	59	FN395039.1
<i>L. naiffi</i>	338	307	286	205	59	FN395056.1
<i>L. lainsoni</i>	338	333	307	125	120	FN395047.1
<i>L. shawi</i>	338	307	286	120	78	GU071177.1
<i>T. cruzi</i>	587	354	269	195	170	XM_812644.1

IDENTIFICACIÓN POR PCR - RFLP DE LA REGIÓN DEL GEN CIT-B

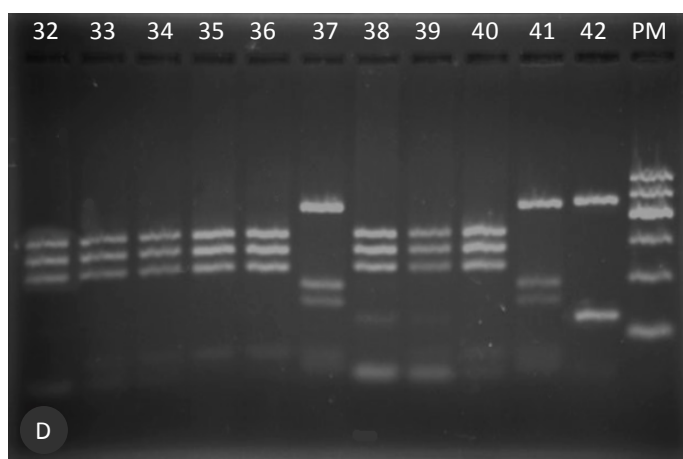
La PCR del gen del cit-b (citocromo b) generó bandas en el rango de 880 pb y la posterior digestión enzimática con la endonucleasa de restricción Ase-I, permitió la detección de diferentes bandas en el rango de 300-100 pb.

De los aislados bolivianos estudiados, 40 (72,7%) mostraron perfiles homólogos a la especie *L. (V.) braziliensis*, mientras que otros 15 (27,3%) no coincidieron con ninguno de los perfiles de las cepas de referencia (Fig. 30). Si bien todos compartían una banda con la cepa de referencia *L. (Leishmania) mexicana* BEL21 (calle 3 y 63) y *Crithidia fasciculata* (Calle 27 y 42).

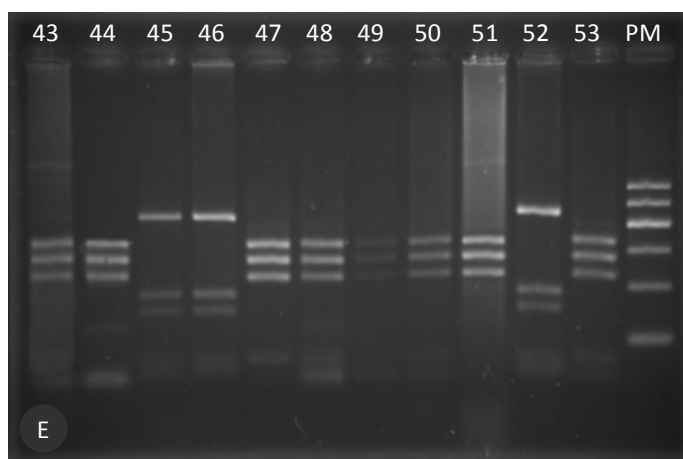




- 21. INL-448-10
- 22. INL-452-10
- 23. INL-459-10
- 24. INL-464-10
- 25. INL-465-10
- 26. INL-466-10
- 27. LB3
- 28. INL-471-10
- 29. INL-474-10
- 30. INL-480-10
- 31. INL-481-10
- PM. Peso molecular



- 32. INL-483-10
- 33. INL-503-10
- 34. INL-505-10
- 35. INL-524-10
- 36. INL-554-10
- 37. INL-560-10
- 38. INL-582-10
- 39. INL-606-10
- 40. INL-626-10
- 41. INL-638-10
- 42. LB3
- PM. Peso molecular



- 43. INL-329-10
- 44. INL-366-10
- 45. INL-371-10
- 46. INL-377-10
- 47. INL-386-10
- 48. INL-396-10
- 49. INL-412-10
- 50. INL-413-10
- 51. INL-414-10
- 52. INL-435-10
- 53. INL-436-10
- PM. Peso molecular

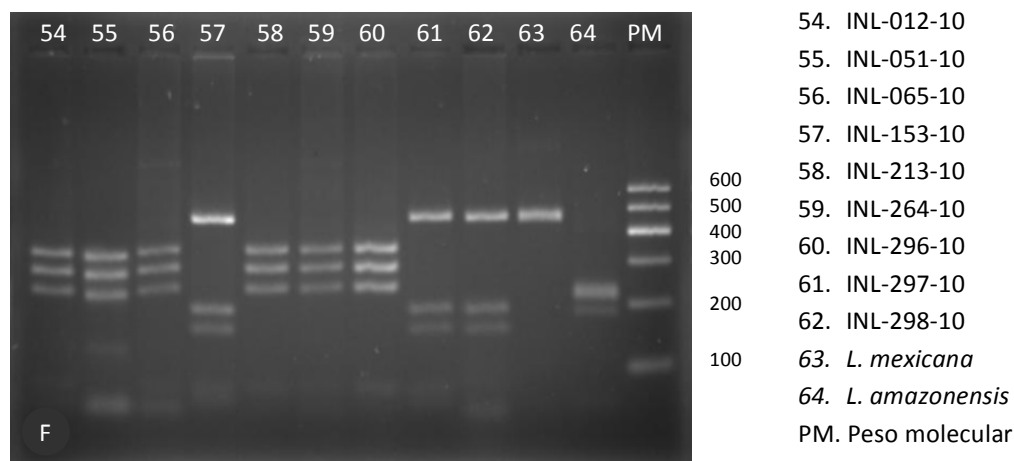


Fig. 30 (A, B, C, D, E y F): Resultados de los perfiles de digestión con la endonucleasa de restricción Ase-I del cit-b.

CARACTERIZACIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN PARCIAL DEL GEN DEL CIT-B

Se obtuvieron los amplicones de 780 pb del gen que codifica para el cit-b de las de los 55 aislados y cepas de referencia. A partir de estos se obtuvieron las secuencias nucleotídicas mediante secuenciación con el secuenciador automático ABI Prism 3730. Después de la edición y el alineamiento global se eliminaron los extremos, obteniéndose secuencias de 583 nucleótidos incluidos GAPs y de 579 una vez eliminados los GAPs.

El alineamiento local de cada secuencia con la función *BLASTn* del NCBI-NIH, determinó la similitud de 36 secuencias con *L. (V.) braziliensis*, de las cuales, 19 resultaron ser idénticas al 100% con la cepa *L. (V.) braziliensis* MHOM/EC/88/INH-03 (AB095967.1), y 17 (16 de las cuales al 100% y 1 al 99,8%) fueron idénticas con la cepa *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 (AB434682.1). Entre estos dos grupos de *L. (V.) braziliensis* se ha identificado una transversión en la posición 49 de G por T y T por G en las 36 secuencias. Además, la secuencia del aislado INL-367-10 presentaba un simple polimorfismo nucleotídico en la posición 27 de G por A. También se ha identificado la homología de 15 secuencias con *L. (Leishmania) mexicana*, de los cuales 14 son

idénticas al 100% y 1 al 99,8% con la cepa *L. (Leishmania) mexicana* Clone:-V3 (AB558229.1), identificado en el estado de Lara, Venezuela. Estas secuencias son también idénticas al 99,8% y 99,7% con la cepa de referencia *L. (Leishmania) mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21 (EF579906.1). La secuencia del aislado INL-255-10 presenta un simple polimorfismo nucleótido en la posición 6 de G por A. Finalmente, las secuencias de 4 aislados fueron homologas a *L. (V.) lainsoni* MHOM/BR/81/M6426 (AB433280.1) con un 99,1% de identidad.

Tabla 11. Regiones conservadas en la región del cit-b de *Leishmania*.

REGIÓN	SECUENCIA	CONSERVACIÓN	SEMEJANZA	Valor-p
1	386-485	0,820	0,945	0,0130
2	421-486	0,833	0,964	0,0244
3	509-579	0,843	0,959	0,0120

El alineamiento global de las 55 secuencias junto a las secuencias conocidas del gen del cit-b derivado de la base de datos del NCBI-NIH, y la eliminación de los extremos de las secuencias dio lugar a secuencias de 583 posiciones con 579 nucleótidos y 4 GAPS. También se han identificado 3 regiones altamente conservadas (Tabla 11), 158 sitios altamente polimórficos con un índice de 0,727 y 121 posiciones evidentemente divergentes (Tabla 12), que están determinados por 17 transiciones (Ts) y 18 transversiones (Tv) con un máximo de verosimilitud estimado de 0,91 Ts/Tv.

La composición porcentual de nucleótidos en *L. (V.) braziliensis* fue de (T) 52,7 - 52,8, (C) 5,7, (A) 27,1 - 27,3 y (G) 14,2 - 14,5%, en *L. (V.) lainsoni* fue de (T) 53, (C) 5,7, (A) 27,3 y (G) 14%, y en *L. (Leishmania) mexicana* fue de (T) 52,3, (C) 6,6, (G) 26,4 - 26,6 y (A) 14,5 - 14,7%. También se ha observado una mayor frecuencia de los pares Timina-Adenina (T+A 79,5%±0,7) y menor de Guanina-Citosina (G+C 20,5%±0,7). Siendo mayor en el subgénero *L. Viannia*, *L. (V.) lainsoni* (T+A 80,3% y G+C 19,7%), *L. (V.) braziliensis* (T+A 79,88%±0,1, G+C 20,12%±0,1) y menor en *L. (Leishmania) mexicana* (T+A 78,8%±0,04 y G+C 21,2%±0,04).

El porcentaje de identidad entre las secuencias de los aislados de *Leishmania* en este estudio fue de 89,3% y la distancia máxima entre ellas fue menor al 10,7% (Fig. 31), formando un solo grupo taxonómico que se correspondía con el género *Leishmania* completamente diferenciado de la secuencia de *T. cruzi* X109/2 (53-57%).

El análisis de los porcentajes de identidad entre las secuencias aisladas con las secuencias de referencia encontradas en la base de datos del NCBI-NIH demostró que 36 secuencias eran idénticas a la secuencia de *L. braziliensis*. Además, mediante el análisis con el DnaSP v5 de estas secuencias se pudieron observar polimorfismos en un simple nucleótido que permitió diferenciar 3 haplotipos (Hap) (Tabla 12):

- Hap_1 (*L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, INL-011-10, INL-012-10, INL-065-10, INL-329-10, INL-386-10, INL-413-10, INL-414-10, INL-436-10, INL-448-10, INL-452-10, INL-466-10, INL-471-10, INL-485-10, INL-503-10, INL-554-10 y INL-582-10) (52,8%).
- Hap_2 (*L. braziliensis* MHOM/EC/88/INH-03, INL-002-10, INL-051-10, INL-213-10, INL-264-10, INL-366-10, INL-412-10, INL-415-10, INL-459-10, INL-464-10, INL-474-10, INL-481-10, INL-483-09, INL-484-10, INL-505-10, INL-518-10, INL-522-10, INL-524-10, INL-606-10 y INL-626-10) (44,4%).
- Hap_3 (*L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, INL-367-10) (2,8%).

En cambio las 4 secuencias idénticas a *L. lainsoni* (INL-296-10, INL-396-10, INL-540-10 y IIFB-01-AS-10) formaban un nuevo haplotipo (Hap_10) en el clado de *L. lainsoni* MHOM/BR/81/M6426 (Hap_9) (Tabla 12).

Por otro lado, las 15 secuencias alineadas con *L. mexicana*, se dividieron en 2 haplotipos (Tabla 12):

- Hap_12 (*L. mexicana* clone: V-3, INL-FLA-09, INL-JTD-09, INL-001-10, INL-097-10, INL-153-09, INL-297-09, INL-298-09, INL-371-10, INL-377-10, INL-435-10, INL-465-10, INL-480-10, INL-560-10 y INL-638-10) (93,3%).

- Hap_15 conformado únicamente por la secuencia del aislado (*L. mexicana*, INL-255-10) (6,7%).

Tabla 12. Posiciones polimórficas, se han excluido las GAPS: **Hap_1**[*L. braziliensis*/AB095967.1, INL-002-10, INL-051-10, INL-213-10, INL-264-10, INL-366-10, INL-412-10, INL-415-10, INL-459-10, INL-464-10, INL-474-10, INL-481-10, INL-483-09, INL-484-10, INL-505-10, INL-518-10, INL-522-10, INL-524-10, INL-606-10 y INL-626-10]; **Hap_2**[*L. braziliensis*/AB434682.1, INL-011-10, INL-012-10, INL-065-10, INL-329-10, INL-386-10, INL-413-10, INL-414-10, INL-436-10, INL-448-10, INL-452-10, INL-466-10, INL-471-10, INL-485-10, INL-503-10, INL-554-10 y INL-582-10]; **Hap_3** [*L. braziliensis*/AB095966.1]; **Hap_4**[INL-367-10]; **Hap_5** [*L. panamensis*/EF579901.1]; **Hap_6**[*L. guyanensis*/EF579905.1]; **Hap_7** [*L. showi*/AB434680.1]; **Hap_8** [*L. naiffi*/AB433279.1]; **Hap_9** [*L. lainsoni*/AB433280]; **Hap_10** [*L. lainsoni*/INL-296-10, INL-396-10, INL-540-10 y IIFB-01-AS-10]; **Hap_11** [*L. mexicana*/EF579906.1, AB095963.1]; **Hap_12** [*L. mexicana*/AB558229.1, INL-FLA-09, INL-JTD-09, INL-001-10, INL-097-10, INL-153-09, INL-297-09, INL-298-09, INL-371-10, INL-377-10, INL-435-10, INL-465-10, INL-480-10, INL-560-10 y INL-638-10]; **Hap_13** [*L. mexicana*/M97357.1]; *L. amazonensis*/AB095964.1, EF579909.1, EF579902.1, HM439238.1 y MHOM/BR/79/MARIA]; **Hap_14** [*L. mexicana*/M92829.1]; **Hap_15** [*L. mexicana*/INL-255-10]; **Hap_16** [*L. donovani*/FJ416603.1]; **Hap_17** [*L. chagasi*/AB095959.1]; **Hap_18** [*L. infantum*/MCAN/ES/83/BCN83]; **Hap_19** [*L. tarentolae*/L07542.1] y **Hap_20** [*T. cruzi*/AJ439726.1].

	10	* 20	* 30	* 40	* 50	* 60	* 70	* 80	* 90	* 100	* 110	* 120
Hap_1	TAGTGGTTGAAACATTTTAACTTCTCTGTTAAATTGAAAAATGATTATTGATTGTAATAAGAAATATGAAGAATAATTTTGATTGTTATATAAAATTTTACTTATTTTCATTATTAAAA											
Hap_2	T.....T.....											
Hap_3	T.....T.....											
Hap_4	A.....T.....											
Hap_5	A.....A.....											
Hap_6	A.....G.....											
Hap_7	A.....T.....											
Hap_8	A.....T.....											
Hap_9	A.....AT.....											
Hap_10	A.....AT.....											
Hap_11	CG..A...A.C...TTT...TAA...G...G...TG...G...G.A..G.A...C.T.A..T..T..TA.AAAT.ACAC..CTAT.T..AC...T...GAAT.GG											
Hap_12	CG..A...A.C...TTT...TAA...G...G...CG...G...G.A..G.A...C.T.A..T..T..TA.AAAT.ACAC..CTAT.T..AC...T...GAAT.GG											
Hap_13	G.AA...A.C...TTT.C.TAA...G...T...C...G...G.A..G.A..T..T.T.A..T.C..TA.AAAT.ACAC..CTAT.T..A...TG...GAAT.GT											
Hap_14	G.AA...A.C...A.TTT.C.TAA...G...T...GAC..AGAGTG.AAGG.A.T..G.T.A..T.C..TA.AAAT.ACAC..CTAT.T..A...TG...GAAT.GT											
Hap_15	C...A...A.C...TTT...TAA...G...G...CG...G...G.A..G.A...C.T.A..T..T..TA.AAAT.ACAC..CTAT.T..AC...T...GAAT.GG											
Hap_16	A..CC.A.CT...T.C...C.G...G...G...G.A..G.A...A.G..TC..A.ACC..A.AC..CT.T.T..A..TA...A..T.ACGAACTG.											
Hap_17	A..CC.A.CT...C..T.T.C...G...G...G...G.A..G.A...A.G..GT...A.ACC...AC..CT.T.T..A..TA...A..T.ACGAACTG.											
Hap_18	A..CC.A.CT...T.C...C.G...G...G...G...G.A..G.A...A.G..TC..A.ACC...AC..CT.T.T..A..TA...A..T.ACGAACTG.											
Hap_19	AA...A..CT...A..TT...GCT..C.G...G...G...G...G.A..G.A...GT..G.A...GC.ACC.CT...TCC.....C.C.T...GAAT.G.											
Hap_20	A.....AT...TT...CTCTA.TATA.G...A.GG.T.C.CTA..G..T...AGTATGAGTTAG.A..T.....A.ATGC.CAG..GATT...GCTTACTCACC.T...GAA.GG.											

Fig. 31. Estimación de los porcentajes de identidad entre especies del género *Leishmania* y el grupo externo *T. cruzi*; INL-626-10 (Hap_1); INL-011-10 (Hap_2); INL-367-10 (Hap_3); IIFB-AS-10 (Hap_9); INL-FLA-09 (Hap_11) y la INL-255-10 (Hap_15).

Fig. 31. Estimación de los porcentajes de identidad entre especies del género *Leishmania* y el grupo externo *T. cruzi*; INL-626-10 (Hap_1); INL-011-10 (Hap_2); INL-367-10 (Hap_3); IIFB-AS-10 (Hap_9); INL-FLA-09 (Hap_11) y la INL-255-10 (Hap_15).

El resultado de los dos árboles demostraron similar topología filogenética con un nivel de confianza del 95% y han generado claramente dos grandes grupos de clados monofiléticos que se corresponden con los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)*, adicionalmente se encuentra un tercer grupo aislado de *L. tarentolae (Sauroleishmania)*, y el grupo externo *T. cruzi*.

Las secuencias de 40 de aislados objeto de nuestro estudio se agrupan en el clado monofilético del subgénero *L. (Viannia)*, de los cuales 36 secuencias (65,5%) se agrupan como un subclado del complejo *L. (V.) braziliensis* y 4 secuencias (7,4%) que se agrupan dentro del complejo *L. (V.) lainsoni*. Las restantes 15 secuencias (27,2%) se agrupan en el subclado del complejo *L. (Leishmania) mexicana* en el clado monofilético del subgénero *L. (Leishmania)* (Fig. 32 y 33).

Adicionalmente a estos árboles, se ha obtenido la red filogenética inferida por la distancia-p no corregida del modelo Neighbor Net (*SplitsTree 4*) de la que se han excluido *L. tarentolae* y *T. cruzi* por su elevada divergencia filogenética (Fig. 34).

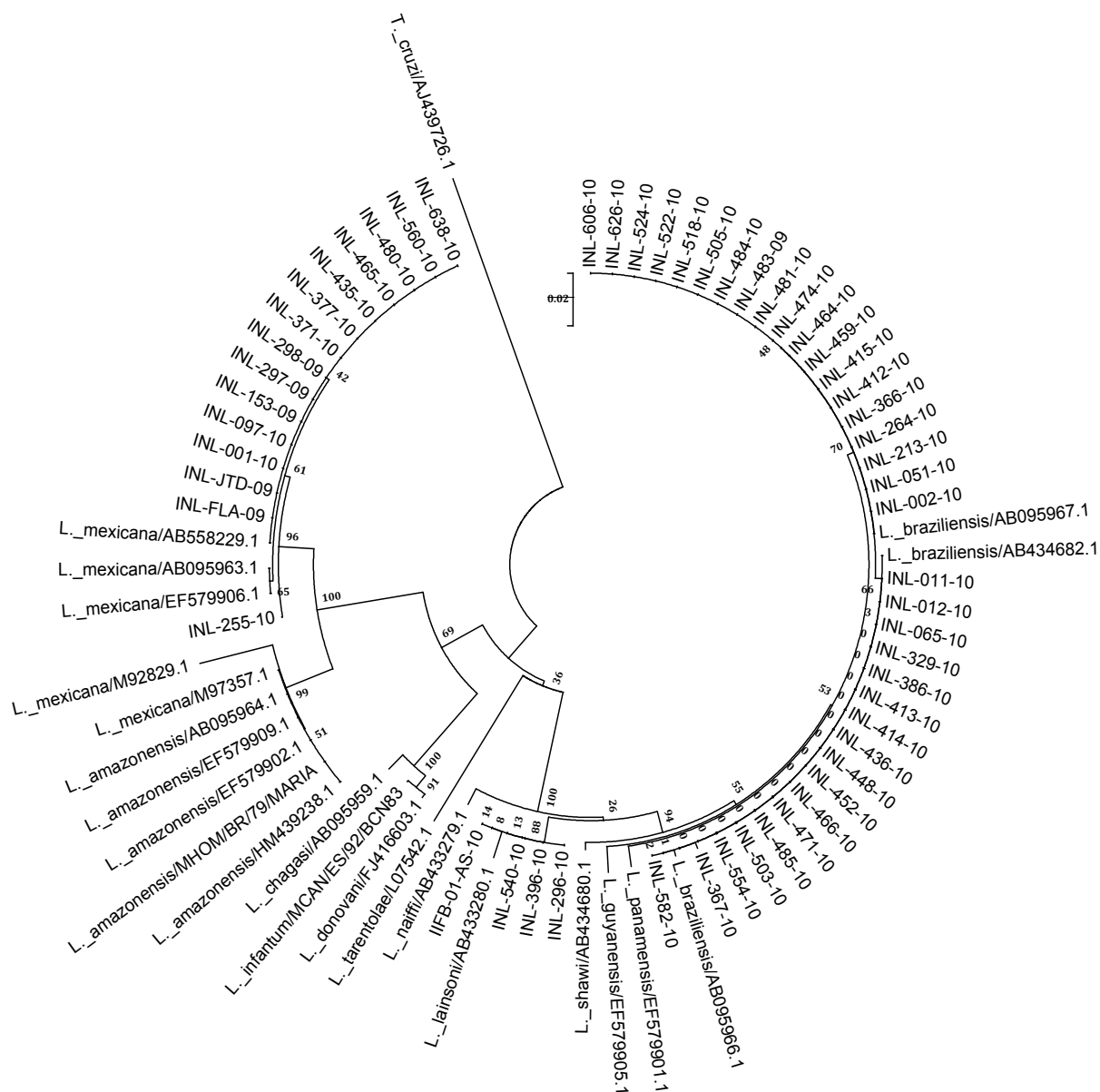


Fig. 32. Relación filogenética molecular por proximidad (*Neighbor Joining*) de *Leishmania*, basado en las secuencias parciales de 55 aislados bolivianos y 23 cepas de referencia. La longitud de las ramas fue construido a escala y calculada mediante el modelo de Kimura de 2-parametros de (0,50756362). Este árbol fue construido para estimar las distancias evolutivas y se realizaron 1.000 pseudoreplicas de “*Bootstrap*” de secuencias.

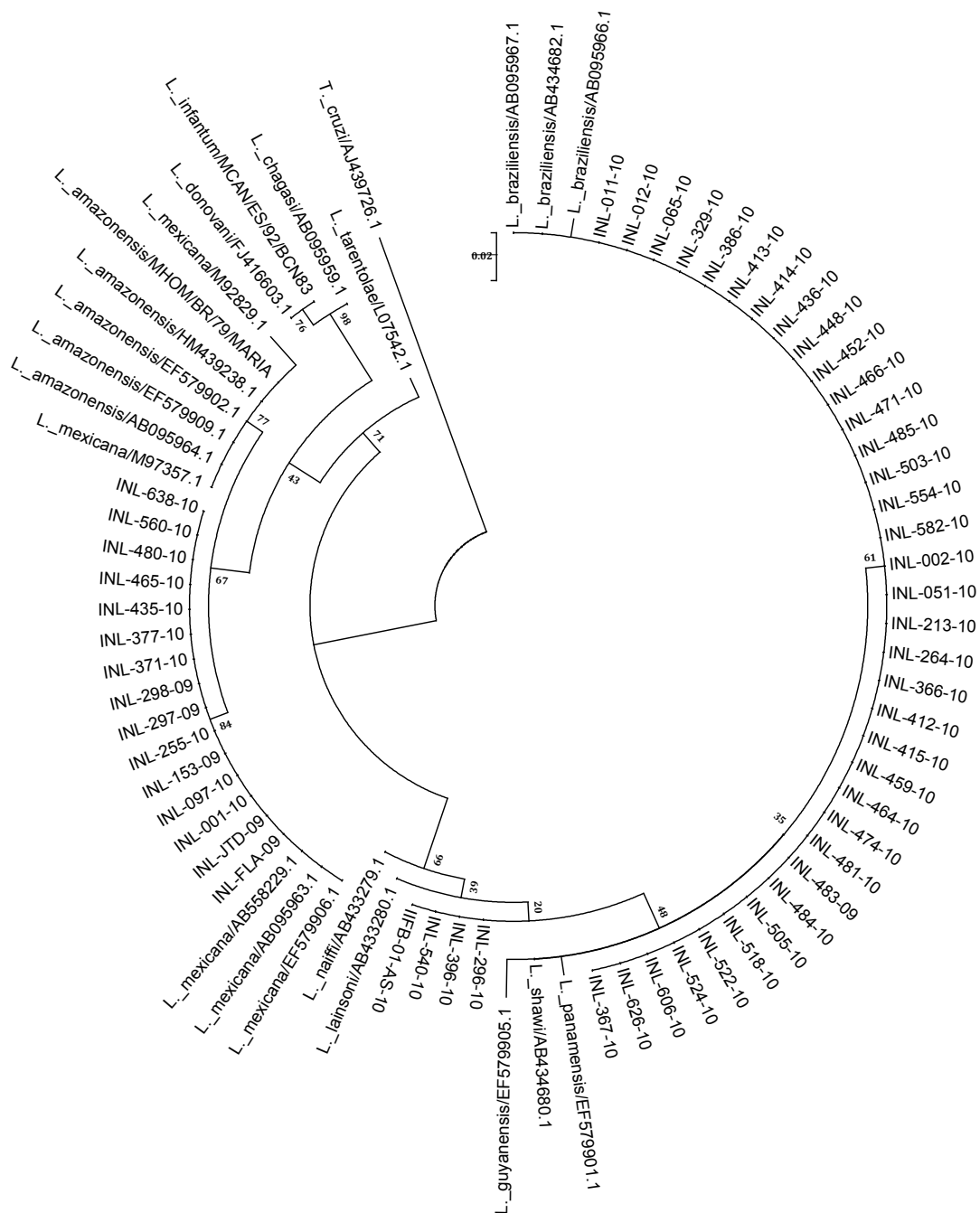


Fig. 33. Relación Filogenética Molecular por mínima evolución (Minimun Evolution) de *Leishmania*, basado en las secuencias parciales de 55 aislados bolivianos y 23 cepas de referencia. Este árbol fue construido a escala por la suma de las longitudes parciales de las ramificaciones = 0.38840927, también fue calculado por el modelo de Kimura de 2-parametros. Este árbol previamente fue diseñado mediante el algoritmo de proximidad (*Neighbor-joining*) y la construcción se realizó con el algoritmo de intercambio con *Close-Neighbor-Interchange* (CNI). Se han realizado 1000 pseudoreplicas "*Bootstrap*" de secuencias.

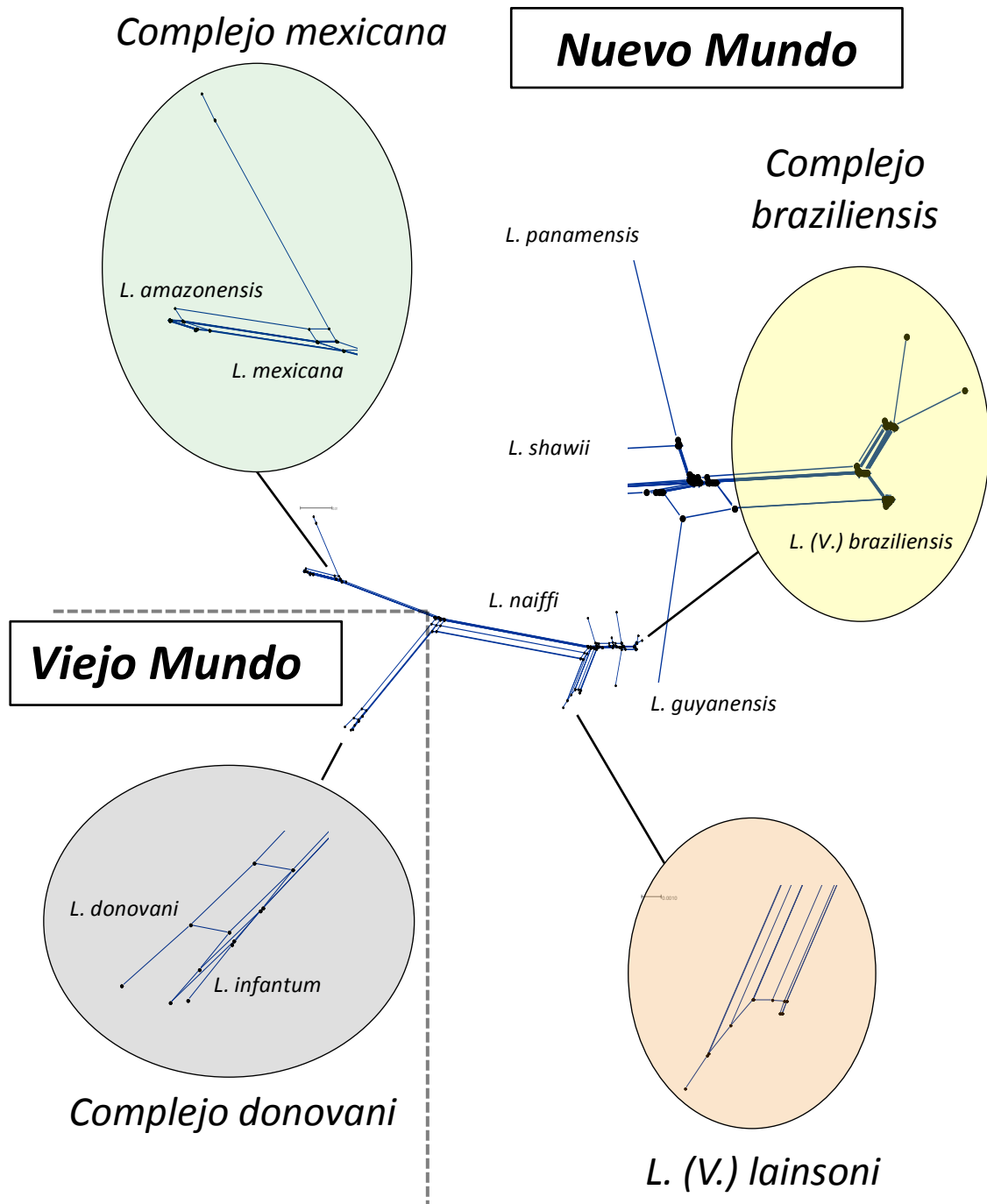


Fig. 34. Red Filogenética molecular de las especies de *Leishmania* basados en las secuencias parciales del cit-b de 579 pb de nucleótidos de 55 aislados bolivianos y 23 cepas de referencia previamente alineadas y analizadas por NJ-Network.

A partir de los resultados obtenidos por los diferentes métodos utilizados para la identificación de las especies circulantes, los resultados se han resumido en la Tabla 13.

Tabla 13. Resumen de los resultados de identificación molecular de los aislados de *Leishmania* bolivianos, obtenidos mediante los métodos de PCR-RFLP de la ITS1, HSP70-I y cit-b, además de la PCR-Secuenciación; Complejo (C); *Leishmania* (L.); *Viannia* (V.); ND, No determinado.

Código	PCR-RFLP			Secuenciación
	ITS-1 (<i>Hae</i> -III)	HSP70 (<i>Hae</i> -III)	CYT- B (<i>Ase</i> -I)	CIT B
INL-001-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-002-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-011-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-012-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-051-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-065-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-097-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-153-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-213-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-255-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-264-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-296-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) lainsoni</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>
INL-297-09	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-298-09	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-329-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-366-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-367-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-371-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-377-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-386-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-396-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) lainsoni</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>
INL-412-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-413-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-414-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-415-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-435-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-436-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>

Código	PCR-RFLP			Secuenciación
	ITS-1 (<i>Hae-III</i>)	HSP70 (<i>Hae-III</i>)	CYT- B (<i>Ase-I</i>)	CIT-B
INL-448-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-452-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-459-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-464-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-465-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-466-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-471-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-474-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-480-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-481-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-483-09	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-484-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-485-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-503-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-505-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-518-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-522-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-524-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-540-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) lainsoni</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>
INL-554-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-560-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-582-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-606-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-626-10	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
INL-638-10	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-FLA-09	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
INL-JTD-09	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>C. L. (L.) mexicana</i>	ND	<i>L. (L.) mexicana</i>
IIFB-01-AS	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>C. L. (V.) lainsoni</i>	<i>C. L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>

Distribución geográfica de la Leishmaniosis en La Paz-Bolivia.

De los 55 aislados de *Leishmania* caracterizadas en este estudio, 51 (92,7%) procedían de pacientes que residían en 8 provincias del Departamento de La Paz, 2 (3,6%) procedían de la provincia Vaca Díez del Departamento de Beni, 1 (1,8%) de la provincia del Chapare en el Departamento de Cochabamba y 1 (1,8%) de un paciente extranjero procedente de Perú.

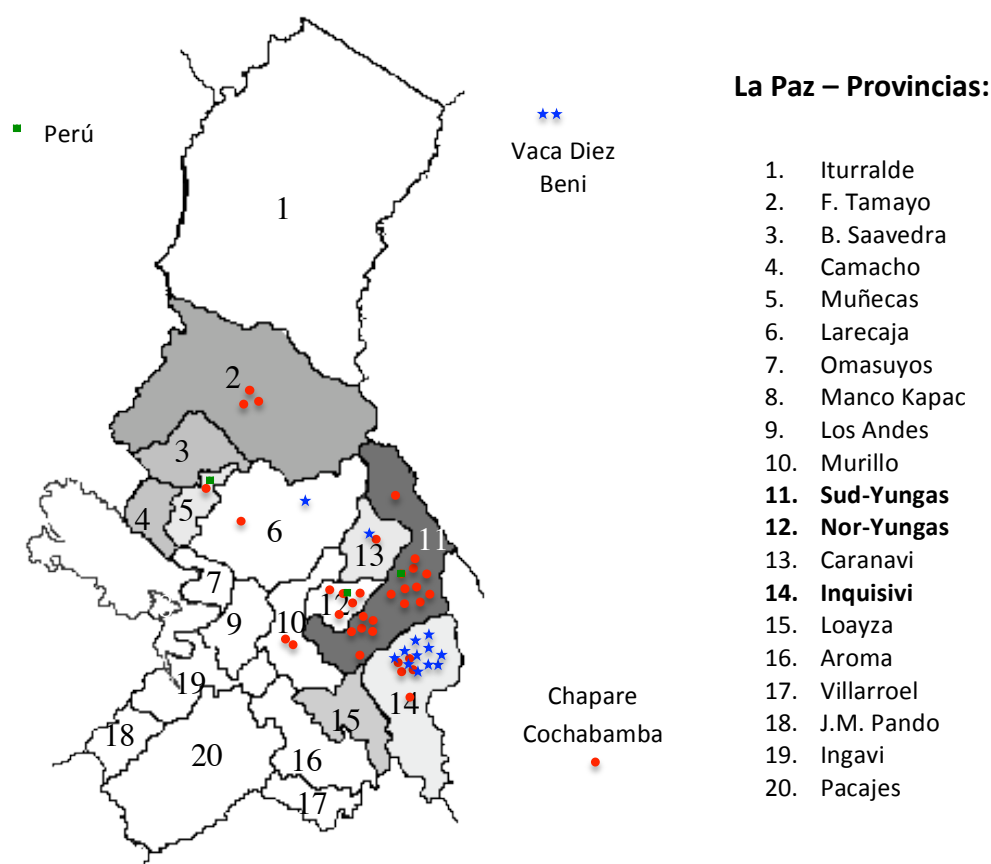


Fig. 35. Mapa político del Departamento de La Paz y distribución de las especies circulantes de *Leishmania*: *L. braziliensis* (●); Complejo *L. mexicana* (★) y *L. lainsoni* (■).

Los aislados se obtuvieron de pacientes procedentes de 8 provincias del Departamento de La Paz, 2 del Departamento del Beni, 1 del Departamento de Cochabamba y 1 del vecino país del Perú. De todas ellas, más del 70% procedían de las provincias Sud-Yungas, Inquisivi y Nor-Yungas (Fig. 35).

L. braziliensis es la especie predominante en 7 de las 8 provincias y más del 61% de los aislados de esta especie se circunscriben a las provincias Nor y Sud Yungas. En cambio, más del 84% de los aislados del Complejo *L. mexicana* se circunscribe a la provincia Inquisivi. Muy pocos aislados fueron caracterizados como *L. lainsoni* y se encontraron en las provincias Muñecas, Nor y Sud Yungas.

Adicionalmente, 2 aislados fueron obtenidos de pacientes con residencia en la Provincia Vaca Díez del Departamento del Beni, ambas fueron caracterizados como especies del Complejo *L. mexicana*. Otro aislado, esta vez de un paciente procedente de la provincia del Chapare del Departamento de Cochabamba, fue caracterizado como *L. braziliensis*. Finalmente, se aisló *Leishmania* de un paciente procedente del Perú, quien desconocía el origen de su infección, y curiosamente el resultado de la caracterización molecular la identificó como *L. lainsoni*.

Según el tipo de lesión, el 92,7% de los pacientes mostraron úlceras cutáneas, un 1,8% eran formas cutáneas difusas y el restante 5,5% fueron lesiones mucocutáneas.

Según el género de los pacientes, el 58,2% de los aislados correspondían a hombres y el resto, un 41,8%, a mujeres.

El grupo etario más afectado fue el comprendido entre 19 y 35 años, con el 31% de los casos, seguido del grupo comprendido entre 35 y 55 años, con el 25,5% y el grupo entre 6 y 18 años con el 23,6%. La frecuencia fue menor para los pacientes mayores de 55 años, con un 12,6% de los casos, y menores de 5 años, con un 7,3% de los casos.

Finalmente, es necesario destacar que mediante la secuenciación del gen del cit-b, se han identificado 2 haplotipos de *L. (V.) braziliensis* circulando en el Departamento de La Paz, caracterizados por el polimorfismo simple de un nucleótido (SNPs), que está determinado por la transversión de Timina por Guanina. El tercer haplotipo de *L. (V.) braziliensis* identificado, corresponde al

aislado de un paciente procedente del Departamento de Cochabamba, y la mutación puntual supone una transversión de Guanina por Timina y una transición de Adenina por Timina. La distribución geográfica de estos haplotipos se describe en la Fig. 36.

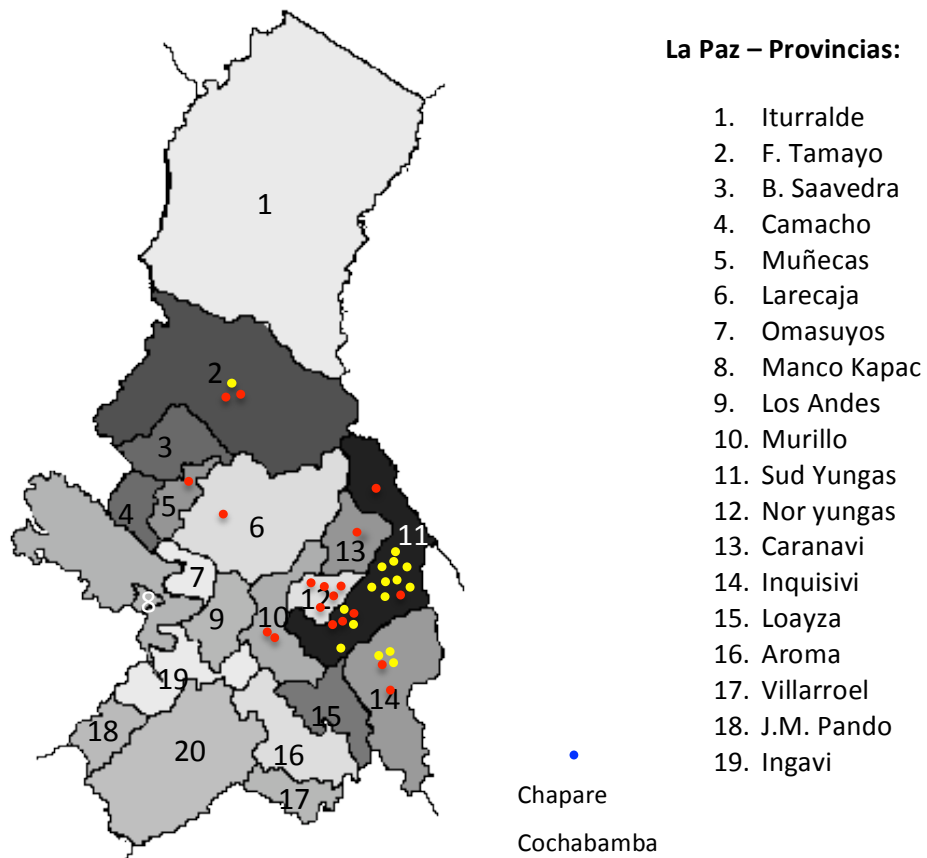


Fig. 36. Mapa político del Departamento de La Paz y la distribución de los haplotipos circulantes de *L. braziliensis*, haplotipo-I (●), haplotipo-II (●) y haplotipo-III (●).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Desde la década de los años ochenta la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) es el método estándar para la caracterización taxonómica de *Leishmania*. Sin embargo, esta herramienta es muy laboriosa, requiere de mucho tiempo y sólo se puede realizar en laboratorios muy especializados. Además de estos inconvenientes, se han descrito limitaciones en la búsqueda de genotipos relacionados con la resistencia a los tratamientos convencionales, capacidad de diferenciación entre la persistencia o la re-infección en pacientes con recaídas y su poder discriminatorio en comparación con los métodos moleculares (Schönian et al. 2011). Mediante estudios por métodos moleculares, se han demostrado que los diferentes perfiles isoenzimáticos por MLEE pueden deberse a múltiples heterocigotos o simplemente a una posición nucleotídica (Jamjoom et al. 2004), o podría no ser consecuencia de la diversidad nucleotídica del gen (Mauricio et al. 2006; Zemanová et al. 2007). Por otro lado, distintos genotipos podrían producir perfiles isoenzimáticos indiferenciados que a su vez expresan fenotipos de distintos zimodemas (Mauricio et al. 2006). Estas desventajas han replanteado su utilización y su sustitución por nuevos métodos moleculares para la reorganización de la taxonomía de *Leishmania* (Fraga et al. 2010; Schönian et al. 2010). Entre estas, se han seleccionado diversos marcadores moleculares a nivel del ADN nuclear, ADN del kinetoplasto y ADN microsatélite, siendo los más estudiados los genes de la proteína HSP-70-I (Fraga et al. 2010), los espaciadores internos de transcripción ITS-1 e ITS-2 (Dávila & Momen 2000; Schönian et al. 2003), los genes que codifican el cit-b a nivel del ADN del kinetoplasto (Luyo-Acero et al. 2004) y los genes de la subunidad 7SL-RNA del complejo de la ribonucleoproteína (Zelazny et al. 2005). Más recientemente se han diseñado métodos moleculares más complejos como la MLST y MLMT (Kuhls et al. 2007; Tsukayama et al. 2009; Schönian et al. 2011) que están desplazando rápidamente a la MLEE en la caracterización taxonómica de *Leishmania*.

Los avances en investigación mediante métodos moleculares están contribuyendo enormemente al conocimiento y la comprensión de *Leishmania*. A pesar de estos avances, continúa siendo un grave problema de salud pública, especialmente en regiones de pobreza extrema. Una de las causas que dificulta el control de esta enfermedad, es la gran variabilidad de especies de *Leishmania* distribuidas alrededor del mundo con diferentes comportamientos y características biológicas, por lo que es importante la contribución a la caracterización de las especies.

Los resultados de este trabajo nos ha permitido identificar a tres entidades taxonómicas de *Leishmania*, aisladas de pacientes con leishmaniosis procedentes del Departamento de La Paz (Bolivia), mediante la combinación de diferentes herramientas moleculares como la PCR-RFLP y secuenciación parcial, utilizando tres marcadores moleculares de la región ITS-1, HSP-70-I y cit-b, nos permitió confirmar la diversidad de especies y sus variaciones intraespecíficas.

El operón ribosomal de *Leishmania* está formado por unidades repetidas en tándem y, debido a aspectos funcionales, se considera que todos los tándem dentro de un mismo genoma son idénticos, siendo un modelo de evolución concertada. La utilidad de la PCR-RFLP del espaciador interno de transcripción ITS-1 para la identificación de especies de *Leishmania*, ha sido evaluada previamente para el diagnóstico de la leishmaniosis, a partir de muestras clínicas en paciente con el Kala Azar y Post-Kala Azar en la India (el Tai et al. 2000).

En nuestro estudio, el perfil de bandas obtenidos de la PCR-RFLP de los productos del ITS-1 digeridos con la enzima *Hae*-III, nos permitió identificar 2 patrones claramente diferenciados, que al ser comparados con las cepas de referencia, uno se correspondía con *L. amazonensis* del complejo *L. (Leishmania) mexicana* y el otro con especies del subgénero *L. (Viannia)*. Estos perfiles coinciden con los resultados publicados por Schönian y colaboradores, quienes identificaron diferentes perfiles de bandas a nivel de complejos del subgénero *L. (Leishmania)* del Viejo Mundo y a nivel de especie en el subgénero *L.*

(*Leishmania*) del Nuevo Mundo. Sin embargo, su utilidad para diferenciar especies del subgénero *L. (Viannia)* se ve limitada por la similitud de bandas entre *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (Fig. 37) (Schönian et al. 2003).

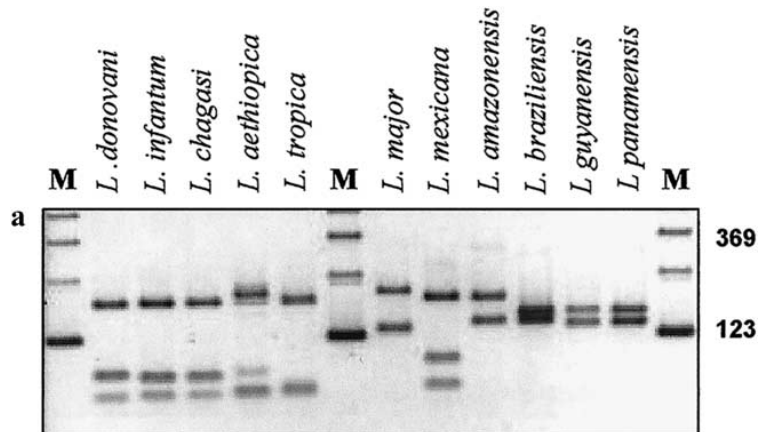


Fig. 37. Digestión de la región ITS-1 con la endonucleasa de restricción *Hae*-III de diferentes especies de *Leishmania*; marcador molecular (M) (Schönian et al. 2003).

En 2002, Dávila y Momen analizaron las secuencias de los espaciadores ITS-1 e ITS-2 de 36 especies de *Leishmania* e identificaron la variabilidad entre los subgéneros *L. (Leishmania)* de *L. (Viannia)*. Al igual que los perfiles de la RFLP con la enzima *Hae*-III, consiguieron agrupar en un mismo clado a *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*, además, claramente diferenciarlos de *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. turanica* y *L. major* del Viejo Mundo. En el Nuevo Mundo las especies *L. amazonensis* y *L. mexicana* forman dos subclados dentro del complejo *L. (L.) mexicana*. En cambio, las especies *L. guyanensis* y *L. panamensis* aparecen agrupados en un mismo clado dentro del subgénero *L. (Viannia)* aunque con variaciones interespecíficas (Dávila & Momen 2000). La variabilidad es mayor dentro del subgénero *L. (Leishmania)*, en especial en las especies del Nuevo Mundo (*L. mexicana* y *L. amazonensis*). Sin embargo, la región ITS es insuficiente para discriminar variabilidad en las especies del subgénero *L. (Viannia)*.

En nuestro estudio, además de la región ITS, hemos utilizado una PCR-RFLP del gen de la HSP70-I con posterior digestión con la enzima *Hae*-III. Estudios previos sobre esta región conservada del genoma de *Leishmania*, han confirmado su utilidad para la diferenciación de especies (Quijada et al. 1997; Arora et al. 1998). Nosotros hemos identificado 3 patrones claramente diferenciados entre ellos, que en comparación con las bandas electroforéticas de las cepas de referencia, corresponden al complejo *L. (Leishmania) mexicana*, complejo *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) lainsoni*. Estos perfiles concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores, quienes, mediante electroforesis capilar de los productos digeridos con la enzima *Hae*-III de la PCR-RFLP de la HSP70 identificaron a *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) lainsoni* en muestras clínicas de pacientes bolivianos procedentes del parque Isiboro Secure del Departamento de Cochabamba (Bolivia). Además, es importante resaltar que los perfiles de las cepas de referencia son similares entre *L. braziliensis* y *L. peruviana*; *L. guyanensis* y *L. panamensis* en el subgénero *L. (Viannia)* y también son similares entre *L. mexicana*, *L. garnhami* y *L. amazonensis* dentro del subgénero *L. (Leishmania)* (García et al. 2004; García et al. 2007a). Más tarde en 2010, Montalvo y colaboradores combinaron 2 enzimas de restricción para confirmar la utilidad de este gen en la identificación de especies de las *Leishmania* que circulan tanto en el Viejo Mundo como en el Nuevo Mundo (Fig. 38) (Montalvo et al. 2010).

Fraga y colaboradores secuenciaron una región parcial de 1380 nucleótidos de la HSP70-I en 16 especies de *Leishmania* para determinar las relaciones filogenéticas, distinguiendo claramente dos clados monofiléticos de los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)*. Entre las especies del Nuevo Mundo se identificaron 5 taxones claramente diferenciados: los complejos *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni* y *L. (V.) naiffi*; entre las especies del Viejo Mundo identificaron a *L. major*, el complejo *L. donovani*, y un grupo compuesto de *L. aethiopica* y *L. tropica* (Fraga et al. 2010). Esta nueva disposición taxonómica, en base a las relaciones filogenéticas del gen de la HSP70 propuesta por Fraga y colaboradores, ha suscitado recientemente la

discusión para un nuevo consenso en la taxonomía de *Leishmania* (Schönian et al. 2010).

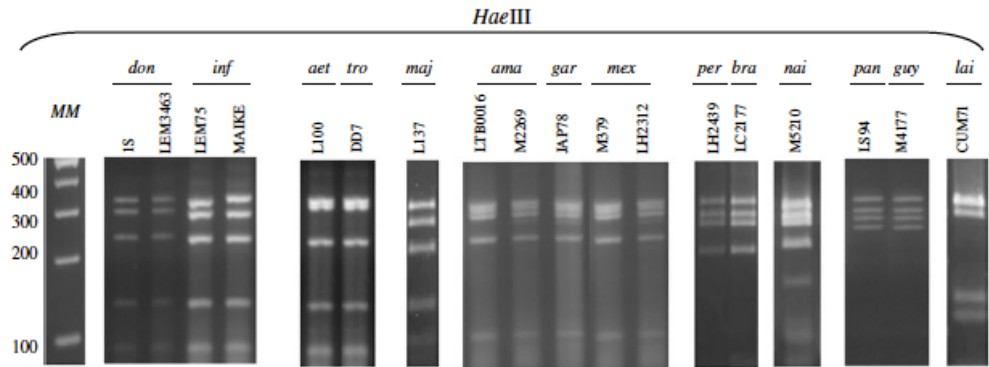


Fig. 38. Digestión de la región HSP70 con la endonucleasa de restricción *Hae*-III de diferentes especies de *Leishmania*; *L. donovani* (*don*); *L. infantum* (*inf*); *L. aethiopica* (*aet*); *L. major* (*maj*); *L. amazonensis* (*ama*); *L. garhnam* (*gar*); *L. mexicana* (*mex*); *L. peruviana* (*per*); *L. braziliensis* (*bra*); *L. naiffi* (*nai*); *L. panamensis* (*pan*); *L. guyanensis* (*guy*); *L. lainsoni* (*lai*); marcador molecular (MM) (Montalvo et al. 2010)

Otro marcador molecular ampliamente utilizado para los análisis filogenéticos es el gen del cit-b; que se considera como uno de los marcadores mitocondriales más fiables en filogenia por tratarse de secuencias altamente conservadas, no sometidas a una presión selectiva en la acumulación de polimorfismos (Meyer 1994; Conway et al. 2000; Serizawa et al. 2000). Estudios anteriores han demostrado que el análisis filogenético basado en los genes del cit-b de *Leishmania* es suficiente para identificar especies de este género (Luyo-Acero et al. 2004; Asato et al. 2009). Por tanto, en nuestro estudio hemos evaluado la utilidad del análisis molecular, basado en la identificación de una región parcial de la secuencia de este gen en los aislados de *Leishmania* que circulan en La Paz (Bolivia).

En este trabajo hemos obtenido secuencias parciales de 579 pb del gen del cit-b (53 %) de los aislados de *Leishmania*, que nos han permitido identificar y analizar los perfiles filogenéticos de *Leishmania*. Otros estudios, también mostraron resultados favorables con secuencias parciales de este gen, de 872 pb (80 %)

(Foulet et al. 2007), 866 pb (80 %) (Marco et al. 2006) y 816 pb (75 %) (Leelayoova et al. 2013).

El gen del cit-b de *Leishmania* presenta un alto contenido de T y A y es semejante al de otros organismos eucariotas (Jermiin et al. 1994; Escalante et al. 1998), así en *Trypanosoma cruzi* este contenido es del 73,5% (Spotorno O et al. 2008) y en *Plasmodium* está alrededor del 73,4% (Perkins & Schall 2002). Luyo-Acero y colaboradores demostraron que el porcentaje de T y A del gen del cit-b de *L. (V.) braziliensis* es del 79% y el del complejo *L. (L.) mexicana* es de 78%, lo que concuerda plenamente con nuestros resultados, tras la secuenciación parcial de este gen (Luyo-Acero et al. 2004). Además, hemos notado que *L. (V.) lainsoni*, es de la especie de *Leishmania* con mayor contenido de T y A (80%).

El análisis de las secuencias parciales del cit-b, nos permitió identificar polimorfismos nucleotídicos intraespecíficos en los aislados identificados como *L. (V.) braziliensis*. El polimorfismo de un simple nucleótido fue determinante en la identificación de 2 haplotipos que están circulando en el Departamento de La Paz, que en base a las secuencias de referencia se corresponden con *L. (V.) braziliensis* MHOM/EC/88/INH-03 (AB095967.1) (Luyo-Acero et al. 2004) y MHOM/BR/75/M2903 (AB344682.1) (Asato et al. 2009). Todos ellos fueron agrupados en un mismo clado monofilético de acuerdo al cladograma por mínima evolución y se divide en 2 clusters en el cladograma de proximidad *Neighbor Joining*. El tercer haplotipo de *L. braziliensis* fue aislado de un paciente del Departamento de Cochabamba (Bolivia) y su secuencia presenta un 99,7% de identidad con la cepa de referencia MHOM/BR/75/M2903. Este polimorfismo nucleotídico no hallado previamente, representa una variante a considerar en estudios de evolución. En concordancia con nuestros resultados, otros trabajos realizados mediante el análisis isoenzimático MLEE en aislados de la región subandina del Departamento de La Paz (Bolivia), identificaron *L. (V.) braziliensis* como la especie predominante (Desjeux et al. 1987). Asimismo, otro estudio

realizado en el Departamento de Pando (Bolivia) confirmó a *L. (V.) braziliensis* como principal especie circulante en esa región (Torres Espejo et al. 1989).

En el clado monofilético de la cepa de referencia *L. (V.) lainsoni* MHOM/BR/81/M6426, previamente aislado y caracterizado por MLEE (Silveira et al. 1987), del que posteriormente fue secuenciada una región parcial de 817 pb del cit-b (Kato et al. 2011), se agrupan 4 de nuestros aislados en un clúster único, con un 99,3% de identidad, situando las mutaciones puntuales en 4 sitios polimórficos.

Sorprendentemente, 15 aislados previamente identificados como *L. (L.) amazonensis*, mediante la PCR-RFLP de la ITS-1, se agruparon en el tercer clado monofilético junto a la cepa de referencia *L. (L.) mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21 (EF579906.1) citada por (Foulet et al. 2007), el *clone:-V3 L. (L.) mexicana* identificado en el estado de Lara Venezuela (AB558229.1) y además del *clone: DCL an* (AB558217) identificado en Ecuador por (Kato et al. 2011), con 99,3%, 100% y 100% de identidad, respectivamente. La divergencia de los aislados con la cepa de referencia MHOM/BZ/82/BEL21 fue confirmado por el perfil de bandas de la PCR-RFLP del cit-b, obtenido de la digestión con la enzima *Ase-I*. En él se aprecia claramente que el perfil de bandas de los 15 aislados comparten solamente una banda con la cepa de referencia de *L. (L.) mexicana* y no así con *L. (L.) amazonensis*. Sumado a esto, la identidad de estas 15 secuencias con las cepas de referencia de *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269 (AB095964 y EF579902), previamente descrita por otros autores (Luyo-Acero et al. 2004; Foulet et al. 2007) solamente alcanzó un 97,4% y 97,2%, respectivamente. En consecuencia, el análisis por PCR-RFLP del cit-b y posterior digestión enzimática con *Ase-I*, ha generado un perfil de bandas diferente al de la cepa de referencia MHOM/BR/78/MARIA. A pesar del bajo nivel de divergencia entre *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) amazonensis*, hemos comprobado por secuenciación y PCR-RFLP de este gen, que las diferencias entre ambas especies son notorias. No

obstante, es importante considerar que estos 15 aislados bolivianos podrían constituir a una variante propia de la región.

Estudios anteriores por análisis MLEE, ya identificaron divergencias de aislados bolivianos con la cepa de referencia de *L. amazonensis* y *L. mexicana*. Así, en la comunidad de Cajuata de la provincia Inquisivi (Departamento de La Paz), se identificó a *L. (Leishmania) amazonensis* como el agente causal de leishmaniosis en esa zona. Sin embargo, su identidad con las cepas de referencia solamente fue del 69% con *L. amazonensis* IFLA:BR:67:PH8 y 30% con *L. mexicana/pifanoi* MNYC:BZ:62:M379/MHOM:VE:57:LV135 (Martínez et al. 1998). En otro estudio, en aislados de pacientes de las comunidades de Cajuata de la provincia Inquisivi, Carrasco de la provincia Caranavi y Quilla Quillani de la provincia Loayza identificaron 6 zimodemas filogenéticamente agrupados con *L. (L.) amazonensis*, todos estos zimodemas, fueron distintos en al menos un locus, siendo la GPI, PGM y 6PGDH los patrones heterocigotos variables (Buitrago et al. 2011).

Más allá de los zimodemas y las divergencias encontradas con las cepas de referencia de *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana*, previamente descritos por Martínez y Buitrago y basándonos en la dicotomía de nuestros resultados, solamente pudimos inferir que los 15 aislados bolivianos comparten características comunes que lo agrupan en el complejo *L. (L.) mexicana*. Además, es importante mencionar que el perfil de bandas obtenidos mediante la PCR-RFLP de la región del ITS-1, revela que los aislados bolivianos son semejantes a *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/79/MARIA, pero no idénticos en su secuenciación (datos no publicados en este trabajo). En cambio la secuenciación parcial y la PCR-RFLP del cit-b proponen su diferenciación de *L. (L.) amazonensis* y los agrupa específicamente con clones de *L. (L.) mexicana* identificados en Ecuador y Venezuela (Kato et al. 2011).

Estas discrepancias junto a las desventajas previamente notificadas de la MLEE en la clasificación taxonómica de *Leishmania*, han permitido que estudios recientes basados en la secuenciación de la HSP70-I, 3'UTR-HSP70-I y HSP20

propusieran una nueva disposición taxonómica de *Leishmania*, en la que se reconoce que *L. mexicana* agrupa, en un único grupo monofilético, a *L. amazonensis*, *L. garnhami* y *L. mexicana*, siendo los polimorfismos reconocidos como subespecies y tipos (Fraga et al. 2010; Schönian et al. 2010; Requena et al. 2012; Fraga et al. 2013). Otro estudio basado en secuencias conservadas del gen de la proteína *LACK* también determinó que la homología entre *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) amazonensis* no corresponde la división de estas entidades taxonómicas (Zhang et al. 2013). En este sentido, en el estudio de secuencias parciales del gen 7SL RNA hallaron un solo SNP entre *L. amazonensis* y *L. mexicana* (Zelazny et al. 2005).

Continuando con la caracterización de especies circulantes en Bolivia, estudios previos por MLEE y PCR RFLP de la HSP70, también han descrito casos aislados de *L. (V.) lainsoni* circulando en los Departamento de La Paz y Cochabamba (Martinez et al. 2001; García et al. 2004), y en concordancia con nuestro estudio, tanto la PCR-RFLP de la HSP70, así como la secuenciación del cit-b confirmaron la presencia de esta especie en el Departamento de La Paz. Aunque, otros estudios describieron casos de leishmaniosis visceral debida a *L. (L.) chagasi/infantum* en el Departamento de La Paz (Martinez et al. 2002), en nuestro estudio no ha sido identificada esta especie.

Finalmente es importante recordar que en la clasificación de *Leishmania*, el concepto de especie biológica no se puede aplicar, y aún no se han alcanzado consensos para la definición de los límites de las especies dentro de este género (Bañuls et al. 1999; Schönian et al. 2010).

CAPÍTULO II

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL CRIBADO FARMACOLÓGICO

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El primer paso y quizá el más importante previo a la determinación de la sensibilidad o búsqueda y selección de compuestos, es la validación de métodos analíticos de laboratorio. Los parámetros establecidos en ésta, serán la garantía en la consolidación de resultados.

En el cribado farmacológico primario de *Leishmania*, se debe considerar las formas promastigotes y amastigotes intracelulares, con especial interés en este último ya que es la forma que parasita al hombre.

En la literatura se puede encontrar diferentes métodos citológicos, moleculares y espectroscópicos, aplicados al cribado farmacológico sobre formas promastigotes. De ellos, los métodos espectroscópicos son los más populares debido a su bajo coste y fácil aplicación en el cribado de alto rendimiento. En cambio, los métodos descritos sobre amastigotes intracelulares, son más costosos, consumen mucho tiempo del personal y no ha sido posible su automatización.

La validación de los métodos espectroscópicos está sujeta a las condiciones de cada laboratorio, considerándose de vital importancia el establecimiento inicial de los parámetros de sensibilidad y linealidad.

Por otro lado, en el modelo de infección *in vitro*, se incorporan variables como el número de amastigotes por célula, número de macrófagos susceptibles y recuperación de parásitos viables después de la liberación de su célula hospedadora.

El objeto de este capítulo es la selección, estandarización y validación de modelos *in vitro* para evaluar la susceptibilidad y búsqueda de compuestos activos frente a las formas promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania*.

En consecuencia, los objetivos concretos son:

1. Determinar las diferentes fases en la curva de crecimiento el modelo *in vitro* de cuatro especies de *Leishmania* del nuevo mundo.
2. Evaluar la sensibilidad y linealidad de los métodos colorimétricos (*p*-NPP y XTT) y fluorimétricos (Resazurina y SybrGreen) para la cuantificación de promastigotes de *Leishmania*.
3. Establecer un modelo de infección *in vitro* de macrófagos J774 con promastigotes de *Leishmania* y optimizar las condiciones para la lisis selectiva de macrófagos J774.
4. Comparar la susceptibilidad farmacológica *in vitro* de los promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania* en el recuento microscópico y el método fluorimétrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

REACTIVOS

PBS 10X (tampón fosfato-salino)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
H ₂ O	c.s.p. 1000mL

PBS-EDTA-Tripsina, pH 7,2

EDTA	0,3 g
Tripsina	0,5 g
PBS 1X	1000 mL

Resazurina 2,5mM

Resazurina	6,2 mg
PBS1	10 mL

Solución de lisis de células *J774*

RPMI	1 g
HEPES	0,476 g
SDS	0,001 g
H ₂ O	c.s.p. 100mL

Filtrar con filtro de 0,22 µm

Medio de cultivo Schneider, pH 6,7

Schneider's Insect Medium	24,5 g
NaHCO ₃	0,4 g
HEPES	4,0 g
SBF	0,1L
Penicilina	0,1 g
Estreptomicina	0,1 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 mL

Filtrar con filtro de 0,22 µm

Medio de Cultivo RPMI, pH 7,2

RPMI-1640	10,4 g
NaHCO ₃	1,2 g
HEPES	4,76 g
SBF	0,1L
Penicilina	0,1 g
Estreptomicina	0,1 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 mL

Filtrar con membrana de 0,22 µm

Medio de Cultivo RPMI-HEPES

RPMI-1640	10,4 g
HEPES	4,76 g
Penicilina	0,1 g
Estreptomicina	0,1 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 mL

Filtrar con filtro de 0,22 µm

CÉLULAS Y PARÁSITOS

PARÁSITOS

Se utilizaron las siguientes cepas de referencia: *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN83) que fue cedida por la Dra. Portús de la Universidad de Barcelona. *L. amazonensis* (MHOH/BR/79/MARIA), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. guyanensis* (141/93) que habían sido cedidas por el Dr. Toraño del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.

CÉLULAS HOSPEDADORAS: MACRÓFAGOS

La línea celular de macrófagos J774, fue comprada al Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid-España. Estas células originalmente fueron aisladas de

células tumorales localizados en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c. (Ralph & Nakoinz 1975).

MÉTODOS

CULTIVO DE PARÁSITOS

Mantenimiento

Los cultivos de *Leishmania* se mantuvieron mediante pases periódicos cada 7 días, en medio Schneider a 26°C en estufa, sin aireación ni humedad

Criopreservación

A partir del primer pase de cultivo, se separaron 1×10^7 promastigotes, en fase de crecimiento logarítmico, que fueron resuspendidos en 1,5 mL de SBF (Suero Bovino Fetal) en criotubos Nunc® y se llevaron a congelación gradual a -20°C durante 2 horas y -80°C toda la noche. Por último se guardaron en tanques con nitrógeno líquido a -196°C.

CULTIVO DE CÉLULAS MACRÓFAGOS J774

Mantenimiento

La línea celular de macrófagos J774, fue mantenida en medio RPMI-1640, mediante pases continuos cada 5 días en frascos de 75cm² e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. La conservación de las células se realizó de igual forma que con los parásitos.

CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS PARÁSITOS

Para la determinación de la curva de crecimiento, se prepararon cultivos en los que se añadieron 2×10^7 promastigotes de cada una de cepas de *Leishmania* a 20 mL de medio Schneider y se mantuvieron a 26°C. Cada 24 horas se determinó la

cinética de crecimiento mediante recuento directo en cámara de Neubauer, durante 10 días. Este experimento fue realizado por triplicado.

CORRELACIÓN LINEAL Y SENSIBILIDAD DE LOS MÉTODOS COLORIMÉTRICOS Y FLUORIMÉTRICOS

Con la finalidad de seleccionar un modelo *in vitro* que cumpliera los criterios de linealidad, sensibilidad, rapidez y de fácil aplicación al cribado farmacológico de compuestos frente a promastigotes de *Leishmania*, se evaluaron diferentes métodos colorimétricos (XTT y *p-NPP*) y fluorimétricos (Resazurina y SybrGreen).

Se realizaron ensayos independientes en microplacas de titulación de 96 pocillos de fondo plano. En todos los ensayos se partió de un cultivo masivo de promastigotes de *Leishmania* en fase de crecimiento logarítmico. El número de parásitos por pocillo se preparó a partir de diluciones seriadas 1:2 desde 1×10^6 hasta $1,95 \times 10^3$, en un volumen final de 200 μL por pocillo. Las lecturas tenían lugar cada hora, durante 4 horas, en espectrofotómetro (ELx808 BioTek) y espectrofluorímetro (Infinite Tecan I-control) (Fig. 39).

Método colorimétrico empleando como sustrato XTT

Los promastigotes fueron resuspendidos en 150 μL de medio Schneider y a continuación se añadieron 50 μL de la XTT-PMS (1 mg/mL y 0,5 mg/mL respectivamente). A continuación, se determinó la densidad óptica en el espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

Método colorimétrico con p-nitrofenilfosfato (p-NPP)

Los promastigotes se resuspendieron en 40 μL de medio Schneider, a continuación se añadieron 50 μL de solución de lisis (citrato de sodio 90mM en 1% de Triton X-100 pH 4,8) y 50 μL de *p-NPP* (10 mM, 5 mM y 1 mM disuelto en H_2O). Después de cada hora se añadieron 60 μL /pocillo de NaOH 1M.

Inmediatamente después se determinó la densidad óptica en espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

Método fluorimétrico usando como sustrato resazurina

Los promastigotes se resuspendieron en 180 μ L de medio Schneider. Inmediatamente después se añadieron 20 μ L/pocillo de una batería de soluciones de resazurina a diferentes concentraciones, 3 mM, 2,5 mM y 2 mM. Las placas se mantuvieron en incubación a 26°C, y cada hora se determinaron las URF (unidades relativas de fluorescencia) en espectrofluorímetro a 535_{ex}-590_{em} nm de longitud de onda. El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las concentraciones.

Método fluorimétrico empleando SybrGreen

Los promastigotes se resuspendieron en 150 μ L de medio Schneider. A continuación se añadieron 50 μ L de solución de SybrGreen, 0,1%, 0,05% y 0,025%, en 10 mM Tris-HCL y 1 mM EDTA. Se mantuvo en incubación a 26°C y cada hora se determinaron las URF en espectrofluorímetro a 485_{ex}-528_{em} nm de longitud de onda. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

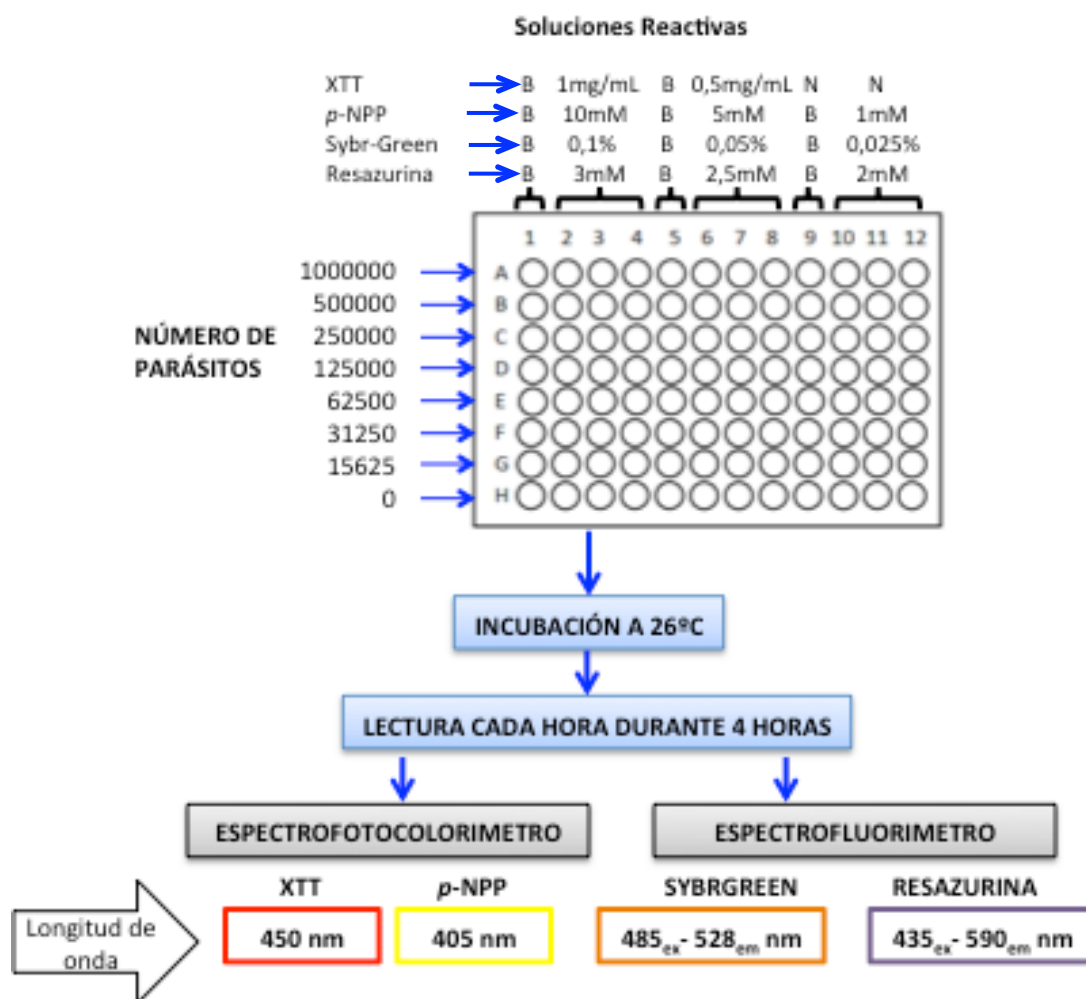


Fig. 39. Esquema de trabajo para determinar la correlación lineal de los métodos de cribado; B, blanco sin reactivos; N, no evaluados.

Los valores de la densidad óptica (DO) y de las unidades relativas de fluorescencia (URF) han sido calculados y analizados mediante ecuaciones de los parámetros estadísticos de regresión lineal [1] y el cálculo del coeficiente de determinación lineal R^2 [2] (Toutenburg 2008). También se utilizaron las fórmulas para el análisis de datos que nos permitieron estimar los límites del blanco (LB) [3] y los límites de cuantificación (LC) [4] (Thomsen et al. 2003), mediante el programa Microsoft Excel v. 2011. También, se consideró el límite de detección (LD) que es directamente proporcional a la sensibilidad del espectro analizador.

$$y = ax + b \quad [1]$$

$$R^2 = \frac{\sigma^2_{XY}}{\sigma^2_X \cdot \sigma^2_Y} \quad [2]$$

$$LB = X_B + 3 \cdot \sigma_B \quad [3]$$

$$LC = X_B + 10 \cdot \sigma_B \quad [4]$$

Ecuación [1]: ordenada en el eje vertical (y); ordenada en el eje horizontal (x); pendiente (a); intersección (b). **Ecuación [2]:** Coeficiente de determinación lineal (R^2); desviación estándar (σ); variable dependiente (X); variable independiente (Y).

Formulas [3 y 4]: límite del blanco (LB); límite de cuantificación (LC); media del blanco (X_B); desviación estándar del blanco (σ_B).

INFECCIÓN *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS J774 CON PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA*

La infección *in vitro* se realizó en placas de 24 pocillos (Costar), en los que se depositaron cubreobjetos estériles de 15mm de diámetro (*Marienfeld* N°1), en el fondo de cada pocillo.

A partir de un cultivo celular, se prepararon diferentes suspensiones de macrófagos J774 (5×10^5 , $2,5 \times 10^5$, $1,25 \times 10^5$ y $0,5 \times 10^5$) en 2 mL de medio de cultivo. Después, se añadieron 400 μ L de cada suspensión y por triplicado a las placas de 24 pocillos, previamente preparadas. Se dejaron en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 2 horas, para permitir la adhesión de las células a la superficie del cubreobjetos. A continuación, se eliminó el sobrenadante para descartar las células no adheridas y finalmente se añadieron 200 μ L de medio RPMI.

Por otro lado, se prepararon diferentes suspensiones de promastigotes en fase estacionaria, a día 7 post-inoculo, a una relación de macrófago : promastigotes 1:10, 1:20 y 1:50, respectivamente (Fig. 40). Estas suspensiones fueron añadidas en un volumen de 200 μ L de RPMI-1640. Se llevó a incubación a 33°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, durante 24 horas, seguido de una subida de la temperatura a 37°C, continuando la incubación durante 24 horas más.



Fig. 40. Diseño del modelo de infección: Macrófago (M); promastigotes (P).

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con PBS. Luego se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con metanol absoluto durante 5 minutos. Posteriormente se tiñeron con Giemsa al 10% durante 15 minutos, tras lo cual se descartó el colorante mediante 2 lavados consecutivos con agua destilada. Tras secarlo a temperatura ambiente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con solución fijadora DPX. Finalmente, se procedió al recuento de amastigotes, macrófagos infectados y no infectados (en total 300 células) en el microscopio óptico.

El porcentaje de macrófagos infectados se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de } M \text{ infectados (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ de } M \text{ infectados}}{N^{\circ} \text{ de } M \text{ no infetados} + N^{\circ} \text{ de } M \text{ infectados}} \times 100$$

Macrófagos (M)

La tasa de infección se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de infección (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ de amastigotes intracelulares}}{N^{\circ} \text{ de macrofagos infectados}} \times 100$$

LISIS SELECTIVA DE MACRÓFAGOS.

Este experimento se llevó a cabo en microplacas de titulación de 96 pocillos. Se preparó una suspensión celular homogénea de células J774, a partir de la cual se añadieron 1×10^5 macrófagos en 200 μL de medio de cultivo RPMI y se incubó a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad, durante 2 horas. A continuación, se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 μL de solución de lisis (1,04% de RPMI-1640 y 0,48% de Hepes) a diferentes concentraciones de SDS (0,01%; 0,009%; 0,008%; 0,007%; 0,006%; 0,005%; 0,004%; 0,003%; 0,002% y 0,001%) (Mauel et al. 1978; Kiderlen & Kaye 1990). Las placas se mantuvieron en agitación constante durante 20 minutos y a continuación se centrifugaron a 3500rpm/5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 μL de medio RPMI con resazurina 2,5 mM. Se volvió a incubar a 37°C , 5% CO_2 y 95% de humedad durante 3 horas. Por último se determinaron las URF (unidades relativas de fluorescencia) a $535_{\text{ex}} - 590_{\text{em}}$ nm de longitud de onda en el espectrofluorímetro (Tecan I-control®).

Se calculó el porcentaje de viabilidad y se seleccionó la concentración mínima letal del 95% de células siguiendo la siguiente formula:

$$\text{Lisis (\%)} = 100 - \frac{\text{URF tratado} - \text{URF blanco}}{\text{URF no tratado} - \text{URF blanco}} \times 100$$

COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE CRIBADO

CRIBADO FARMACOLÓGICO IN VITRO SOBRE PROMASTIGOTES

Este experimento fue realizado en paralelo: en microplacas de titulación de 96 pocillos de fondo plano (Fig. 41).

Los compuestos fueron disueltos en DMSO, a la concentración de 50 mg/mL. En tubos eppendorf® se prepararon diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar, mediante diluciones seriadas 1:2 en medio Schneider.

Miltefosina [µg/mL]	AnB [µg/mL]
200,00	10,00
100,00	5,00
50,00	2,50
25,00	1,25
12,50	0,63
6,25	0,31
3,13	0,16
1,56	0,08

En las microplacas se añadieron 100 µL por pocillo de los compuestos previamente preparados a diferentes concentraciones y por triplicado.

Se preparó una suspensión homogénea de promastigotes de *Leishmania* en fase de crecimiento logarítmico a $1,25 \times 10^6$ promastigotes/mL. De esta suspensión se añadieron 100 µL a los pocillos tratados y no tratados, el grupo de pocillos no tratados se enrasó a 200 µL con medio Schneider; además se añadió un blanco que contenía únicamente 200 µL del medio. Todos se incubaron a 26°C durante 48 horas

Una microplaca se dejó para el recuento directo en cámara de Neubauer y a la otra se le añadieron 20 µL de solución de resazurina 2,5 mM en PBS, por pocillo. Se incubó 3 horas más a 26°C, y a continuación se determinó las URF a 535_{ex} - 590_{em} nm de longitud de onda en el espectrofluorímetro (Infinite Tecan I-

control). En ambos casos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento y la concentración inhibitoria media (IC₅₀) por el método de regresión multinomial *Probit*, utilizando el paquete estadístico SPSS v.20.0.

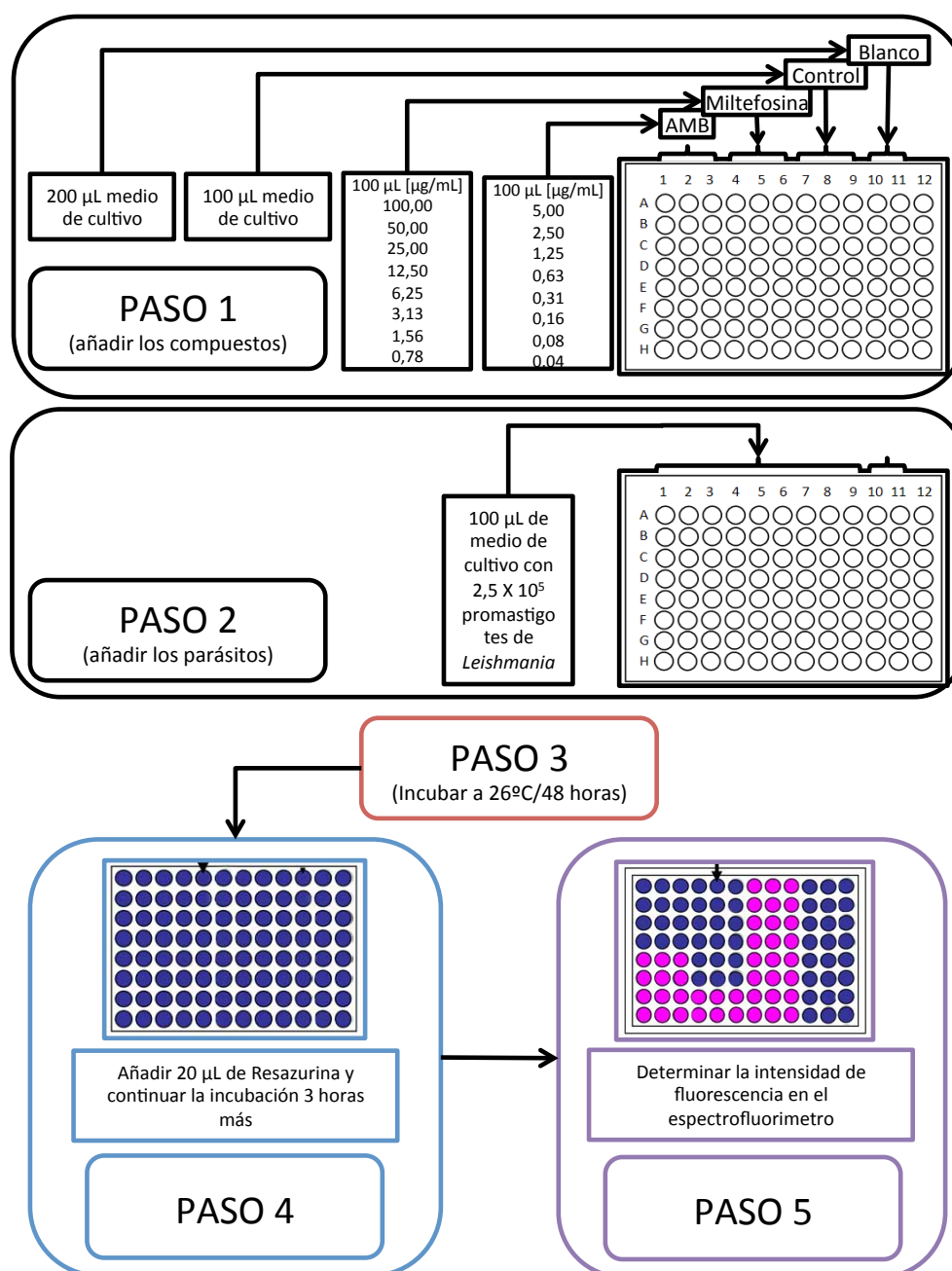


Fig.41. Representación esquemática del cribado farmacológico.

CRIBADO FARMACOLÓGICO IN VITRO SOBRE AMASTIGOTES INTRACELULARES

En este experimento se evaluó la correlación entre un método fluorimétrico y el recuento microscópico para el cribado farmacológico frente a amastigotes intracelulares de *Leishmania*. A tal fin, el trabajo se desarrolló en paralelo utilizando microplacas de titulación 96 pocillos y cámaras de 8 pocillos (LabTek®).

Se prepararon suspensiones homogéneas de macrófagos-J774 y promastigotes de *Leishmania*, a día 7 de cultivo, a la concentración de 5×10^5 macrófagos/mL y 5×10^6 promastigotes/mL respectivamente.

Primero se dispusieron 100 μ L de la suspensión de macrófagos-J774 en cada pocillo de las microplacas y en las cámaras LabTek®, se dejaron en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 2 horas. Luego se infectaron con los promastigotes previamente preparados, añadiendo 100 μ L de la suspensión, dejando un grupo control de lisis sin infectar. Se incubaron a 33°C bajo las mismas condiciones de aireación y humedad. A las 24 horas, se subió la temperatura a 37°C y se continuó la incubación otras 24 horas más.

A continuación se eliminó el sobrenadante y se realizaron lavados consecutivos con medio RPMI-HEPES hasta eliminar los promastigotes libres en el medio. Inmediatamente después se añadieron 100 μ L de medio RPMI en los pocillos con los compuestos y 200 μ L en los controles de crecimiento y de lisis.

Se prepararon diferentes concentraciones de AnB y Miltefosina:

Miltefosina [μ g/mL]	AnB [μ g/mL]
100,00	20,00
50,00	5,00
25,00	2,50
12,50	1,25
6,25	0,63
3,13	0,31
1,56	0,16
0,8	0,08

Cada una de estas concentraciones fue añadida por triplicado a los pocillos de las microplacas y las cámaras LabTek®, hasta un volumen final de 200 µL. Se continuó la incubación a 37°C por 48 horas más en las mismas condiciones de aireación y humedad. Finalmente, se descartó el sobrenadante. En las cámaras LabTek® se realizaron 2 lavados con solución de PBS, se secaron a temperatura ambiente, se fijaron con metanol absoluto y se tiñeron con Giemsa al 10%.

En las microplacas se añadieron 200 µL de solución de lisis con SDS al 0,006% y se dejó en agitación durante 20 minutos. Después se centrifugó a 3.500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se descartó la solución de lisis y se añadieron 200 µL de medio Schneider, seguido de incubación a 26°C durante 72 horas. Posteriormente se añadieron 20 µL de resazurina al 2,5 mM y se continuó la incubación 3 horas más. Por último, se realizó la lectura en el espectrofluorímetro (Infinite Tecan I-control) a 535_{ex} -590_{em} nm de longitud de onda para determinar las URF. En ambos casos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento y la concentración inhibitoria media (IC₅₀) mediante regresión multinomial *Probit*, utilizando el paquete estadístico SPSS v.20.0.

RESULTADOS

RESULTADOS

CURVA DE CRECIMIENTO

La viabilidad *in vitro* de *Leishmania* se mide por su capacidad de multiplicación en un determinado medio de cultivo, lo que determina una característica propia de cada especie. En este experimento, se ha comparado la cinética de crecimiento *in vitro* de las cepas de referencia del género *Leishmania* utilizadas en este estudio. Para ello se registraron los recuentos del número de parásitos viables cada 24 horas durante 10 días de cultivo. En la Tabla 14 y Fig. 42 se pueden observar los resultados obtenidos en este experimento expresados en millones de parásitos por mililitro con su respectiva desviación estándar.

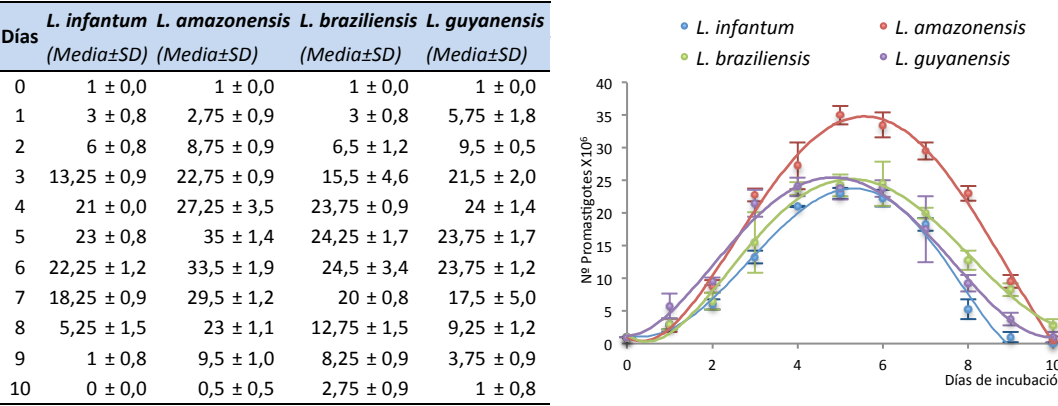


Tabla 14 y Fig. 42. Curva de crecimiento de los promastigotes en medio de cultivo Schneider; desviación estándar (SD).

En la cinética de crecimiento se observa que durante las primeras 24 horas los promastigotes de las cuatro especies se encuentran en fase de adaptación al medio de cultivo. Después, en todas especies se observa un período de crecimiento logarítmico hasta el cuarto día, que en *L. amazonensis* se extiende hasta el quinto día. La fase estacionaria se extiende hasta el séptimo día, seguida

de la fase de decaimiento en todas las especies. *L. amazonensis* se multiplica más que las otras especies, en cambio *L. braziliensis* prolonga su viabilidad más allá del décimo día de cultivo.

SENSIBILIDAD Y LINEALIDAD DE LOS MÉTODOS DE CRIBADO

Los métodos espectroscópicos son ampliamente utilizados en el cribado farmacológico de alto rendimiento. Sin embargo, antes de su aplicación es necesaria su validación en cada laboratorio. Así, hemos evaluado métodos colorimétricos y fluorimétricos previamente descritos para el cribado farmacológico de *Leishmania*. En este sentido se determinó la sensibilidad y correlación lineal como relación entre el número de promastigotes versus intensidad de la señal (densidad óptica o unidades relativas de fluorescencia). También se han considerado los límites de detección y los límites de cuantificación de cada técnica.

Método colorimétrico XTT.

En *Leishmania*, al igual que algunos organismos unicelulares, la conversión enzimática de la sal de XTT [2,3-Bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida], se produce a nivel del metabolismo mitocondrial, dando lugar a un derivado soluble llamado formazán. Este compuesto es de color amarillo y mediante espectroscopia se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm.

Los promedios de las densidades ópticas (X_{DO}) obtenidas a 1 y 0,5 mg/mL de XTT, se muestran en la Tabla 15. En ambos experimentos, se evidencia que la DO es directamente proporcional al número de parásitos y varía en función del tiempo de exposición y la concentración del sustrato XTT. En la Fig. 43 (a y b) se representa gráficamente la correlación lineal de los ensayos realizados, determinada por el coeficiente de determinación lineal (R^2), de forma que a

diferentes tiempos de incubación el R^2 se mantiene por encima de 0,989 y 0,970 a 1 y 0,5 mg/mL de XTT, respectivamente.

Tabla 15. Valores de la densidad óptica (DO) promedio \pm desviación estándar (DE) a 450 nm de longitud de onda incubados con diferentes concentraciones de XTT.

Nº Parásitos	XTT 1 mg/mL				XTT 0,5 mg/mL			
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4
	$X_{DO} \pm DE$	$X_{DO} \pm DE$	$X_{DO} \pm DE$	$X_{DO} \pm DE$	$X_{DO} \pm DE$	$X_{DO} \pm DE$	$X_{DO} \pm DE$	$X_{DO} \pm DE$
1000000	0,665 \pm 0,021	0,826 \pm 0,021	1,055 \pm 0,032	1,262 \pm 0,037	0,614 \pm 0,010	0,641 \pm 0,009	0,576 \pm 0,015	0,557 \pm 0,004
500000	0,406 \pm 0,013	0,535 \pm 0,006	0,726 \pm 0,024	0,823 \pm 0,019	0,410 \pm 0,003	0,426 \pm 0,005	0,435 \pm 0,001	0,437 \pm 0,003
250000	0,329 \pm 0,009	0,440 \pm 0,007	0,597 \pm 0,006	0,674 \pm 0,006	0,356 \pm 0,003	0,368 \pm 0,001	0,372 \pm 0,001	0,377 \pm 0,002
125000	0,288 \pm 0,010	0,379 \pm 0,003	0,516 \pm 0,012	0,580 \pm 0,013	0,331 \pm 0,003	0,342 \pm 0,004	0,346 \pm 0,004	0,350 \pm 0,004
62500	0,259 \pm 0,009	0,342 \pm 0,005	0,462 \pm 0,006	0,519 \pm 0,006	0,319 \pm 0,003	0,332 \pm 0,004	0,335 \pm 0,003	0,341 \pm 0,005
31250	0,245 \pm 0,012	0,322 \pm 0,007	0,431 \pm 0,005	0,485 \pm 0,011	0,315 \pm 0,001	0,326 \pm 0,001	0,327 \pm 0,003	0,334 \pm 0,001
15625	0,238 \pm 0,006	0,313 \pm 0,003	0,415 \pm 0,004	0,463 \pm 0,006	0,309 \pm 0,005	0,321 \pm 0,005	0,321 \pm 0,003	0,328 \pm 0,004
Blanco	0,219 \pm 0,033	0,288 \pm 0,048	0,410 \pm 0,001	0,454 \pm 0,001	0,311 \pm 0,006	0,320 \pm 0,005	0,328 \pm 0,003	0,326 \pm 0,006

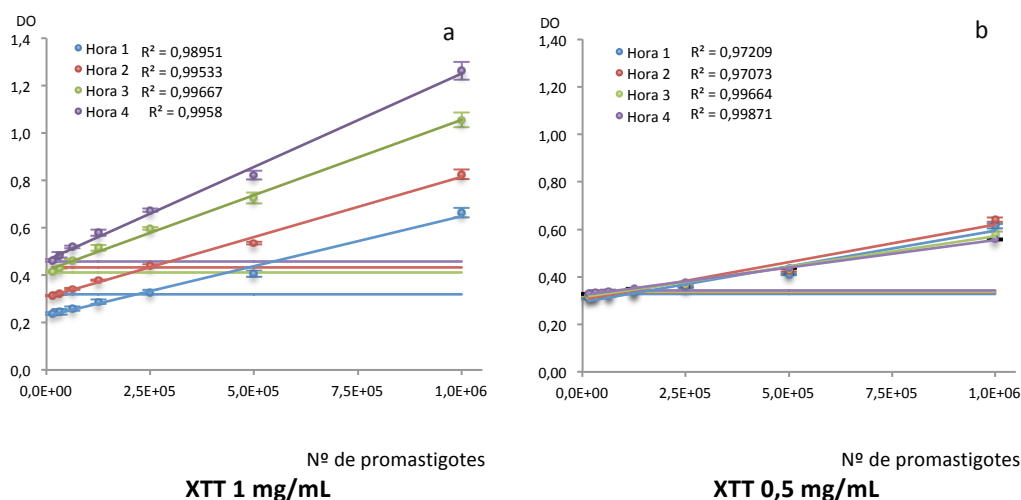


Fig. 43. Resultados de la recta de regresión lineal y el coeficiente de determinación R^2 con concentraciones de 1mg/mL (a) y 0,5mg/mL (b) de XTT; las líneas horizontales representan los límites del blanco; densidad óptica (DO).

La sensibilidad del método está determinada por la DO del blanco. Ésta a su vez nos permitió calcular el límite del blanco (LB) y límite de cuantificación (LC). Los límites calculados que se describen en la Tabla 16, nos permitieron constatar que después de 3 horas de incubación con 1 mg/mL de XTT, el método es capaz de

detectar la actividad enzimática de ~15.625 promastigotes resuspendidos en 200 μ L, es decir, presenta una mayor resolución en comparación al ensayo realizado con 0,5 mg/mL, incluso después de 4 horas de incubación de XTT, a pesar de que la sensibilidad permitía detectar ~15.625 promastigotes en 200 μ L.

Tabla 16. Valores calculados del límite del blanco (LB) y límite de cuantificación (LC).

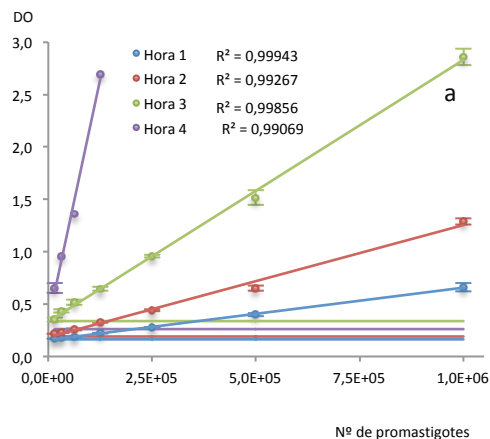
	XTT 1 mg/mL				XTT 0,5 mg/mL			
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4
LB	0,319	0,432	0,411	0,458	0,328	0,335	0,337	0,343
LC	0,554	0,768	0,415	0,466	0,366	0,368	0,358	0,381

Método colorimétrico de la fosfatasa alcalina.

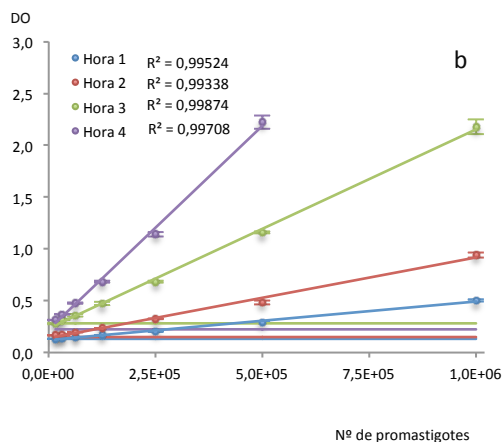
El *p*-NPP (*p*-Nitro Fenil Fosfato) es un cromógeno incoloro que se utiliza para detectar la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina. Esta reacción da como resultado un grupo fosfato y el *p*-nitrofenol que en medio alcalino presenta un color amarillento, cuantificable a 405 nm.

Al igual que en el método anterior, la DO es directamente proporcional al número de parásitos y la reacción está dada en función del tiempo de exposición y la concentración del *p*-nitrofenol. Los valores promedio de la DO (X_{DO}) obtenidos a diferentes tiempos de incubación y diferentes concentraciones de *p*-NPP (10, 5 y 1 mM), se muestran en la Tabla 17 (a, b y c). El *p*-NPP es muy reactivo y el tiempo de exposición es crucial en la cuantificación, por lo que es importante resaltar que, después de 4 horas de incubación con 10 y 5 mM de *p*-NPP, la DO es superior al límite de detección del espectrofotómetro (>3,00) en los pocillos con 1×10^6 , 5×10^5 y $2,5 \times 10^5$ promastigotes en 200 μ L. En cambio el grupo incubado con 1 mM de *p*-NPP, apenas alcanzaba la DO de 1,5 después de 4 horas de exposición.

Nº Parásitos	10 mM de p-NPP				a
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	
	X _{DO} ± DE	X _{DO} ± DE	X _{DO} ± DE	X _{DO} ± DE	
1000000	0,661 ± 0,040	1,289 ± 0,030	2,86 ± 0,079	>3,000	
500000	0,399 ± 0,014	0,651 ± 0,026	1,517 ± 0,073	>3,000	
250000	0,28 ± 0,002	0,44 ± 0,010	0,959 ± 0,015	>3,000	
125000	0,222 ± 0,004	0,325 ± 0,006	0,644 ± 0,018	2,693 ± 0,048	
62500	0,19 ± 0,001	0,258 ± 0,010	0,519 ± 0,026	1,359 ± 0,010	
31250	0,174 ± 0,004	0,23 ± 0,007	0,434 ± 0,017	0,959 ± 0,009	
15625	0,169 ± 0,002	0,217 ± 0,003	0,351 ± 0,019	0,654 ± 0,009	
Blanco	0,161 ± 0,000	0,19 ± 0,000	0,324 ± 0,005	0,251 ± 0,003	



Nº Parásitos	5 mM de p-NPP				b
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	
	X _{DO} ± DE	X _{DO} ± DE	X _{DO} ± DE	X _{DO} ± DE	
1000000	0,502 ± 0,0094	0,942 ± 0,0253	2,177 ± 0,0699	>3	
500000	0,293 ± 0,0009	0,483 ± 0,0208	1,158 ± 0,0088	2,224 ± 0,0650	
250000	0,203 ± 0,0015	0,324 ± 0,0035	0,684 ± 0,0120	1,142 ± 0,0217	
125000	0,168 ± 0,0009	0,236 ± 0,0009	0,473 ± 0,0149	0,684 ± 0,0120	
62500	0,148 ± 0,0008	0,195 ± 0,0012	0,361 ± 0,0142	0,476 ± 0,0067	
31250	0,139 ± 0,0001	0,176 ± 0,0020	0,319 ± 0,0063	0,368 ± 0,0027	
15625	0,134 ± 0,0006	0,165 ± 0,0013	0,277 ± 0,0056	0,315 ± 0,0024	
Blanco	0,128 ± 0,0015	0,148 ± 0,0004	0,251 ± 0,0104	0,193 ± 0,0103	



Nº Parásitos	1 mM de p-NPP				c
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	
	X _{DO} ± DE	X _{DO} ± DE	X _{DO} ± DE	X _{DO} ± DE	
1000000	0,233 ± 0,0048	0,392 ± 0,0081	0,762 ± 0,0173	1,492 ± 0,0260	
500000	0,151 ± 0,0018	0,223 ± 0,0018	0,411 ± 0,0042	0,962 ± 0,0173	
250000	0,121 ± 0,0025	0,161 ± 0,0002	0,286 ± 0,0017	0,611 ± 0,0042	
125000	0,108 ± 0,0010	0,133 ± 0,0003	0,218 ± 0,0032	0,386 ± 0,0017	
62500	0,1 ± 0,0006	0,118 ± 0,0013	0,187 ± 0,0018	0,218 ± 0,0032	
31250	0,098 ± 0,0011	0,114 ± 0,0010	0,165 ± 0,0032	0,187 ± 0,0018	
15625	0,097 ± 0,0012	0,11 ± 0,0004	0,158 ± 0,0015	0,165 ± 0,0032	
Blanco	0,095 ± 0,0019	0,106 ± 0,0039	0,141 ± 0,0030	0,159 ± 0,0010	

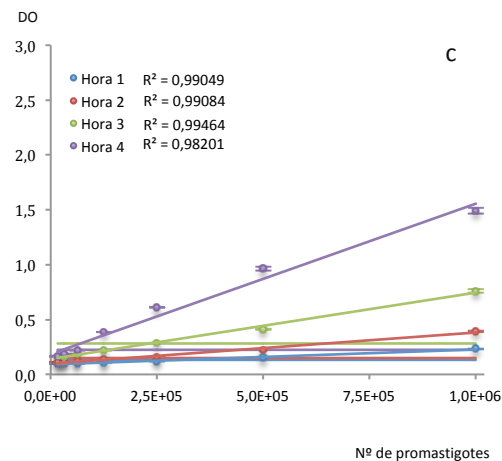


Tabla 17 (a, b y c). Valores de la densidad óptica (DO) promedio \pm desviación estándar (DE) a 405 nm de longitud de onda incubados a diferentes concentraciones de p-NPP; límite de detección (DO = 3).

Fig. 44 (a, b y c). Representación de la recta de regresión lineal, coeficiente de determinación (R^2) y límite del blanco (líneas horizontales) a diferentes concentraciones de p-NPP.

La correlación lineal entre el número de parásitos y la DO está dada en función del tiempo de exposición, y se representa gráficamente en las Fig. 44 (a, b y c). En todos los ensayos el R^2 fue mayor a 0,991; 0,993 y 0,982 a 10, 5 y 1 mM de p-

NPP respectivamente. Sin embargo, es importante destacar que después de 3 horas de incubación con 10mM de p-NPP, el R^2 es mayor a 0,998 y la máxima DO de 1×10^6 parásitos fue de $2,86 \pm 0,079$; además, el LB fue de 0,338 y el LC 0,371 que permite cuantificar desde ~ 15.625 parásitos en 200 μ L. En cambio la incubación con 5 y 1 mM establece al LC en 0,355 y 0,171 que permite cuantificar ~ 62.000 y ~ 51.000 parásitos en 200 μ L, respectivamente, después de 3 horas de incubación, (Tabla 18).

Tabla 18. Valores calculados del límite del blanco (LB) y límite de cuantificación (LC).

D O	p-NPP 10 mM				p-NPP 5 mM				p-NPP 1 mM			
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4
LB	0,163	0,191	0,338	0,260	0,132	0,149	0,282	0,224	0,101	0,117	0,150	0,161
LC	0,166	0,192	0,371	0,284	0,143	0,152	0,355	0,296	0,114	0,145	0,171	0,168

Método Fluorimétrico del SYBR-Green I

El Sybr-Green tiene la capacidad de intercalarse en la doble hélice de ADN, preferentemente entre los pares de G–C lo que exacerba su fluorescencia, que resulta directamente proporcional a la concentración de ADN. A diferencia de los métodos enzimáticos, con Sybr-Green se mide la concentración de ADN total del parásito, independientemente de su viabilidad. El Sybr-Green libre en solución acuosa emite una débil fluorescencia que corresponde al LB, y a partir de ésta se calcula el LC. La emisión de fluorescencia va a ser por tanto directamente proporcional a la concentración de ADN. Las unidades relativas de fluorescencia (URF) pueden medirse en espectrofluorímetro a $485_{\text{ex}} - 535_{\text{em}}$ nm.

Los valores promedio de las unidades relativas de fluorescencia (X_{URF}) obtenidos a diferentes tiempos de incubación con 0,1%; 0,05% y 0,025% de Sybr-Green, se muestran en la Tabla 19 (a, b y c). Cabe destacar que, a 0,05% y 0,025% de Sybr-Green, la lectura de las URF se mantiene constante durante las 4 horas de incubación. En cambio con 0,1%, las URF se mantienen constantes entre 1 y 2

horas y, después de 3 y 4 horas de incubación, disminuyen aproximadamente un 10%.

Nº Parásitos	Sybr-Green 0,10 %				a
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	
	$X_{URF} \pm DE$	$X_{URF} \pm DE$	$X_{URF} \pm DE$	$X_{URF} \pm DE$	
1000000	44939 ± 507	44625 ± 996	41113 ± 1099	40613 ± 848	
500000	27772 ± 986	27038 ± 289	24583 ± 1273	23583 ± 769	
250000	19566 ± 380	19282 ± 203	16229 ± 229	15563 ± 549	
125000	16116 ± 586	15190 ± 213	11990 ± 675	12090 ± 420	
62500	13913 ± 515	13254 ± 208	9570 ± 531	9804 ± 271	
31250	12847 ± 640	12085 ± 438	8962 ± 479	8628 ± 099	
15625	11899 ± 096	12075 ± 398	7636 ± 221	7836 ± 088	
Blanco	11342 ± 118	11881 ± 479	7238 ± 118	7605 ± 486	

Nº Parásitos	Sybr-Green 0,05 %				b
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	
	$X_{URF} \pm DE$	$X_{URF} \pm DE$	$X_{URF} \pm DE$	$X_{URF} \pm DE$	
1000000	39437 ± 807	41418 ± 870	40362 ± 788	39029 ± 436	
500000	25071 ± 160	24671 ± 226	22948 ± 679	22752 ± 378	
250000	17705 ± 321	17344 ± 333	14511 ± 939	14411 ± 230	
125000	13656 ± 400	12778 ± 593	10410 ± 780	10077 ± 748	
62500	11531 ± 522	10945 ± 693	8155 ± 227	7921 ± 325	
31250	10056 ± 382	9768 ± 465	7171 ± 544	6671 ± 157	
15625	9133 ± 148	8778 ± 091	6512 ± 248	6278 ± 181	
Blanco	8884 ± 654	8508 ± 582	6056 ± 089	5989 ± 375	

Nº Parásitos	Sybr-Green 0,025 %				c
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	
	$X_{URF} \pm DE$	$X_{URF} \pm DE$	$X_{URF} \pm DE$	$X_{URF} \pm DE$	
1000000	30667 ± 1048	35523 ± 684	30476 ± 1026	32143 ± 623	
500000	18843 ± 337	20882 ± 963	17539 ± 431	18769 ± 723	
250000	13187 ± 579	14037 ± 523	10332 ± 479	12132 ± 510	
125000	10025 ± 730	10787 ± 605	7531 ± 377	9098 ± 142	
62500	8630 ± 387	8880 ± 233	6072 ± 193	6905 ± 064	
31250	7491 ± 156	7156 ± 169	5182 ± 320	5382 ± 028	
15625	6926 ± 128	6648 ± 128	4412 ± 083	4945 ± 159	
Blanco	6430 ± 210	6158 ± 292	4148 ± 142	4515 ± 255	

Tabla 19 (a, b y c). Valores de las unidades relativas de fluorescencia (URF) promedio \pm desviación estándar (DE) a 485_{ex} – 535_{em} nm, incubados a diferentes concentraciones de SybrGreen.

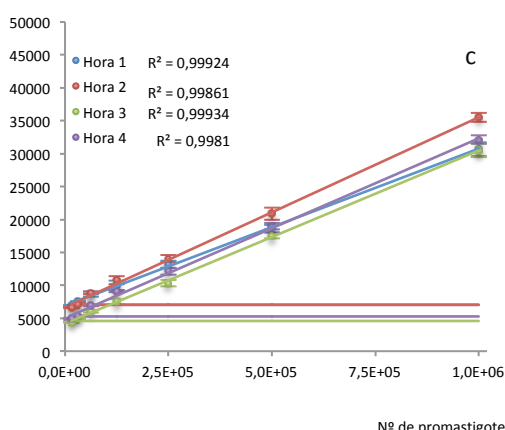
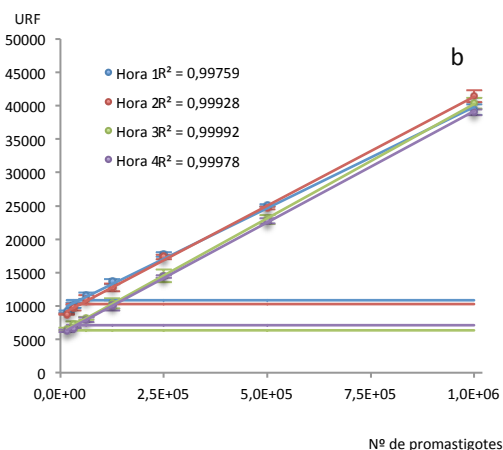
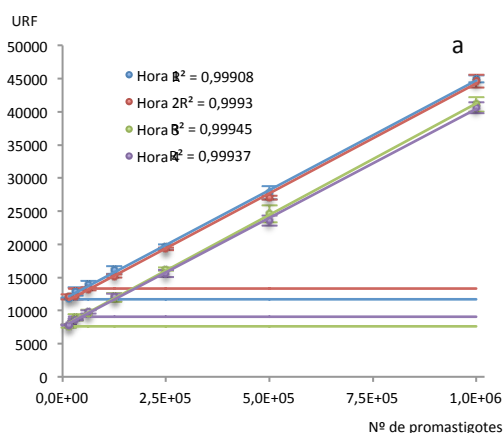


Fig. 45 (a, b y c). Representación de la recta de regresión lineal, coeficiente de determinación (R^2) y límite del blanco (líneas horizontales) a diferentes concentraciones de SybrGreen.

La correlación lineal entre el número de parásitos y las URF a diferentes tiempos de incubación se representa gráficamente en las Fig. 45 (a, b y c). En todos los casos el R^2 fue mayor a 0,997, lo que significa una correlación muy alta del método. En cuanto a la sensibilidad, el LB y el LC indican que después de 3 y 4 horas de incubación, la fluorescencia se reduce notablemente, lo que no sucede a la 1 y 2 hora con 0,1% y 0,05% de Sybr-Green. En cambio a 0,025% el LB y LC se mantienen constantes. La URF del LB es inferior a la emisión con 15.625 promastigotes en 200 μ L, sin embargo el LC será mayor a 60.000 promastigotes en todos los casos (Tabla 20).

Tabla 20. Valores calculados del límite del blanco (LB) y límite de cuantificación (LC).

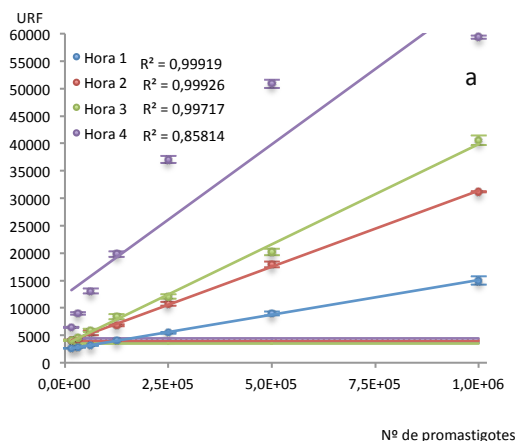
DO	Sybr-Green 0,1 %				Sybr-Green 0,05 %				Sybr-Green 0,025 %			
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4
LB	11696	13318	7591	9061	10845	10253	6324	7114	7061	7033	4574	5279
LC	12524	16669	8416	12460	15420	14327	6949	9738	8532	9075	5569	7063

Método Fluorimétrico de la resazurina.

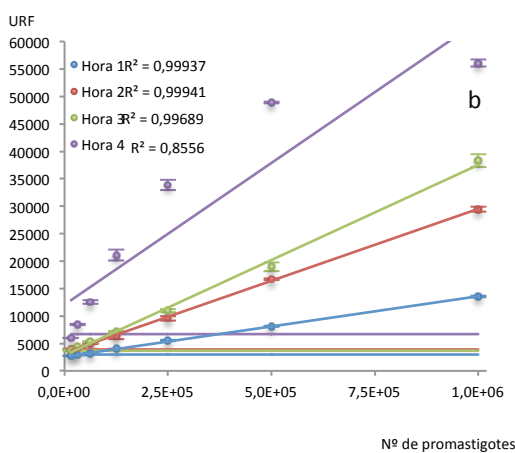
La resazurina es un fluorocromo ampliamente utilizado en la determinación de la viabilidad celular. Al igual que los anteriores métodos colorimétricos, mide la actividad enzimática de las células viables, y las enzimas que participan en la reducción a nivel mitocondrial son la FMDH, FADH, NADH y citocromos; algunas de estas enzimas también pueden encontrarse a nivel microsomal y citoplasmático. La resazurina reducida a resorufina, emite fluorescencia que puede ser leída en un fluorímetro a 535_{ex} – 590_{em}nm.

Los valores promedio de las unidades relativas de fluorescencia (X_{URF}) obtenidos a diferentes tiempos de incubación con 3, 2,5 y 2 mM de resazurina, se muestran en las Tablas 21 (a, b y c). Al igual que el *p*-NPP, la resazurina 3 mM es muy reactiva y después de 4 horas de exposición excede el límite de lectura del espectrofluorímetro (60000 URF), por lo tanto es importante considerar las lecturas antes de las 3 horas de incubación en todos los casos.

Nº Parásitos	Resazurina 3mM				a
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	
	X _{URF} ± DE	X _{URF} ± DE	X _{URF} ± DE	X _{URF} ± DE	
1000000	14994 ± 752	31156 ± 086	40564 ± 862	59382 ± 309	
500000	8993 ± 352	17936 ± 530	20218 ± 619	50865 ± 766	
250000	5444 ± 146	10745 ± 404	12060 ± 401	37029 ± 660	
125000	4104 ± 014	6807 ± 208	8394 ± 464	19798 ± 503	
62500	3152 ± 041	5501 ± 476	5905 ± 286	13102 ± 458	
31250	2820 ± 018	4236 ± 026	4603 ± 064	8978 ± 213	
15625	2614 ± 086	4115 ± 032	4044 ± 114	6413 ± 067	
Blanco	2493 ± 368	3814 ± 032	3340 ± 036	4309 ± 030	



Nº Parásitos	Resazurina 2,5 mM				b
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	
	X _{URF} ± DE	X _{URF} ± DE	X _{URF} ± DE	X _{URF} ± DE	
1000000	13529 ± 127	29472 ± 459	38263 ± 1174	56088 ± 675	
500000	8148 ± 121	16718 ± 172	18944 ± 771	48901 ± 151	
250000	5532 ± 148	9566 ± 403	10979 ± 300	33854 ± 919	
125000	4006 ± 023	6316 ± 537	7120 ± 197	21067 ± 995	
62500	3197 ± 047	4949 ± 037	5313 ± 142	12567 ± 345	
31250	2852 ± 044	4180 ± 022	4482 ± 034	8459 ± 111	
15625	2740 ± 042	3952 ± 059	3739 ± 051	5998 ± 051	
Blanco	2665 ± 104	3668 ± 062	3509 ± 038	4103 ± 855	



Nº Parásitos	Resazurina 2,5 mM				c
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	
	X _{URF} ± DE	X _{URF} ± DE	X _{URF} ± DE	X _{URF} ± DE	
1000000	11948 ± 329	25446 ± 387	33826 ± 557	52692 ± 663	
500000	7425 ± 426	12930 ± 241	18024 ± 462	48013 ± 526	
250000	5078 ± 239	7793 ± 171	10792 ± 1052	34485 ± 316	
125000	3931 ± 152	5777 ± 074	7326 ± 400	21137 ± 742	
62500	3340 ± 014	4550 ± 048	5459 ± 123	12916 ± 173	
31250	2942 ± 009	4143 ± 021	4372 ± 043	8497 ± 189	
15625	2699 ± 059	3916 ± 016	3735 ± 050	6172 ± 182	
Blanco	2706 ± 078	3576 ± 072	3393 ± 021	4236 ± 058	

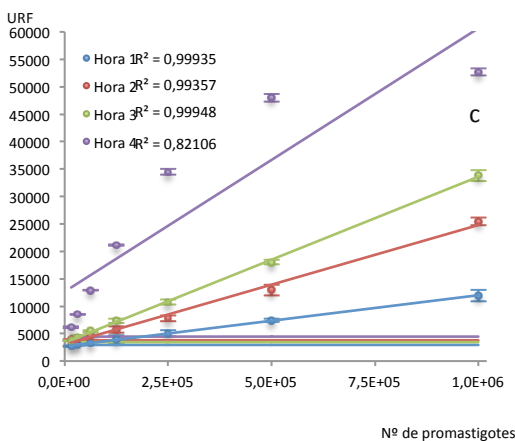


Tabla 21 (a, b y c). Valores de las unidades relativas de fluorescencia (URF) promedio ± desviación estándar (DE) a 535_{ex} – 590_{em} nm, incubados a diferentes concentraciones de resazurina.

Fig. 46 (a, b y c). Representación de la recta de regresión lineal, coeficiente de determinación (R^2) y límite del blanco (líneas horizontales) a diferentes concentraciones de resazurina.

En las Fig. 46 (a, b y c), se puede observar que durante las 3 primeras horas, la correlación lineal entre el número de parásitos y las URF es muy alta con un R^2 mayor a 0,997; 0,006 y 0,993 a 3, 2,5 y 2 mM de resazurina, respectivamente. Sin embargo, después de 4 horas de incubación el R^2 disminuye a 0,855 y 0,821 a las concentraciones de 2,5 y 2 mM, con notable pérdida de la linealidad, donde el LD del espectrofluorímetro es de 60.000 URF.

En cuanto al LB y el LC se puede observar que la variación de las URF, no es significativa respecto de los tiempos de incubación ni concentración de la resazurina. Después de 3 horas de incubación, en todos los ensayos, los valores del LB y LC son inferiores a la intensidad de fluorescencia emitida por la actividad de 15.000 promastigotes en 200 μ L (Tabla 22).

Tabla 22. Valores calculados del límite del blanco (LB) y límite de cuantificación (LC).

DO	Resazurina 3mM				Resazurina 2,5 mM				Resazurina 2 mM			
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4
LB	3596	3909	3449	4400	2975	3852	3622	6669	2941	3791	3456	4409
LC	6171	4131	3703	4612	3700	4283	3887	12658	3488	4292	3605	4813

INFECCIÓN *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS J774 CON PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA*.

Con la finalidad de establecer la relación óptima de infección de macrófagos con promastigotes, se dispusieron diferentes suspensiones de macrófagos J774 en micropocillos y se procedió a infectarlos con promastigotes de *Leishmania amazonensis*, a la relación macrófago: promastigotes 1:10. 1:20 y 1:50. En la Fig. 47 se muestran los resultados de dicha infección.

En la Tabla 23 se reflejan los resultados expresados en porcentaje de macrófagos infectados. Se puede observar que en los pocillos con 1×10^5 macrófagos infectados a la relación 1:50 se alcanza el mayor porcentaje de infección ($39 \pm 4\%$). Sin embargo, no presenta diferencias significativas con los pocillos con

1×10^5 macrófagos infectados a la relación 1:20 y 1:10, tampoco con los pocillos con 5×10^4 macrófagos infectados a la relación 1:50 y 1:20 ($p > 0.05$). En cambio, si existen diferencias significativas en comparación con los pocillos con 5×10^4 macrófagos infectados a la relación 1:10. Es importante mencionar que el porcentaje de infección se reduce drásticamente cuando se dispone menor número de macrófagos (2.5×10^4 y 1.25×10^4), independientemente de la relación macrófago: promastigotes (1:10, 1:20 y 1:50). También se observó que la menor tasa de infección se producía en los pocillos con 1.25×10^4 macrófagos y promastigotes a la relación 1:10 ($p < 0.05$).

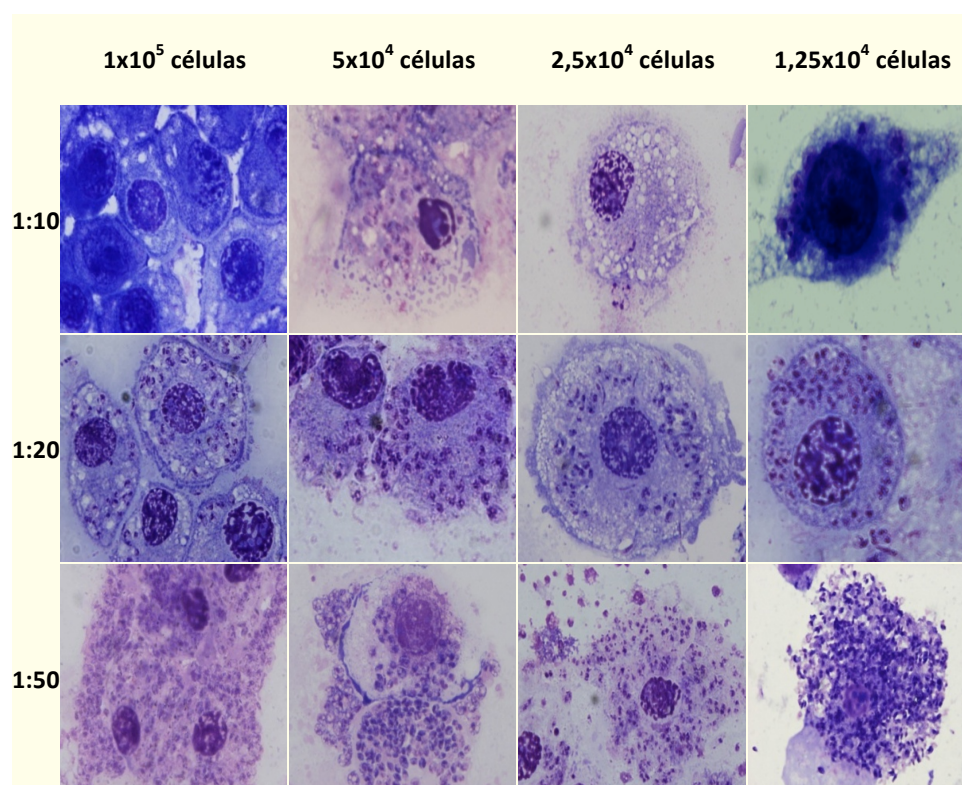


Fig. 47. Infección experimental. Determinación de la relación óptima entre el número macrófagos J774 y promastigotes infectantes.

Se seleccionó la combinación 5×10^4 macrófagos y la relación 1:10 de promastigotes ya que presentaban un porcentaje mayor al 30% de macrófagos infectados, para determinar la tasa de infección *in vitro* de las especies de referencia de *Leishmania*. Ésta se determinó mediante el recuento de los

amastigotes por cada 300 macrófagos (Fig. 48). Los resultados evidencian que la tasa de infección por macrófago, es estadísticamente mayor ($p<0,01$) en *L. amazonensis* y *L. guyanensis* en comparación con *L. braziliensis* y *L. infantum*.

Tabla 23. Porcentaje de macrófagos J774 susceptibles a la infección *in vitro* con promastigotes de *L. amazonensis*.

	1×10^5	5×10^4 células	2.5×10^4 células	1.25×10^4 células
1:10	35% \pm 4%	31% \pm 3%	12% \pm 2%	3% \pm 1%
1:20	36% \pm 3%	32% \pm 4%	16% \pm 4%	15% \pm 4%
1:50	39% \pm 4%	36% \pm 4%	20% \pm 3%	20% \pm 2%

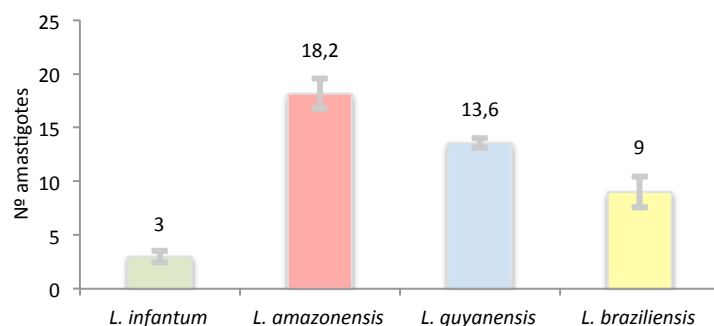


Fig.48. Tasa de infección *in vitro* de macrófagos J774 con promastigotes de distintas especies.

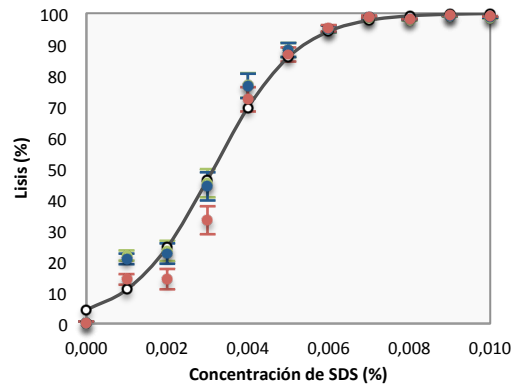
LISIS SELECTIVA DE MACRÓFAGOS.

La lisis selectiva de los macrófagos permite la liberación al medio de los amastigotes, que pueden evolucionar fácilmente a formas promastigotes que pueden ser más fáciles de cuantificar. Para ello se ha utilizado SDS, que es un tensoactivo iónico que provoca la lisis celular.

Como se pretendía lisar exclusivamente los macrófagos, pero no los amastigotes, se prepararon diferentes concentraciones de SDS (0,001 a 0,01), que se añadieron sobre 50.000 macrófagos J774, para determinar la concentración mínima letal, después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente y agitación constante. La lisis celular fue determinada por la actividad enzimática

de las células viables. En la curva de letalidad (Fig. 49), se encontró que la concentración de 0.006% de SDS inhibe la actividad celular por encima del 95% y que la letalidad era del 100%, de forma que cuando se observaron al microscopio con el colorante vital azul trypan no se observaron células viables.

Fig.49. Curva de letalidad de macrófagos J774 en función de la concentración de SDS. Cada punto representa la media \pm SD de 3 experimentos y la línea sólida fue ajustada por regresión logarítmica.



CORRELACIÓN ENTRE LA SUPERVIVENCIA Y LA EMISIÓN DE FLUORESCENCIA.

En este experimento se resume el proceso de infección experimental *in vitro* de macrófagos J774 con suspensiones de promastigotes, su conversión en amastigotes intracelulares, la lisis selectiva de los macrófagos J774, la liberación de los amastigotes intracelulares y su transformación en promastigotes viables y así como su cuantificación por fluorimetría.

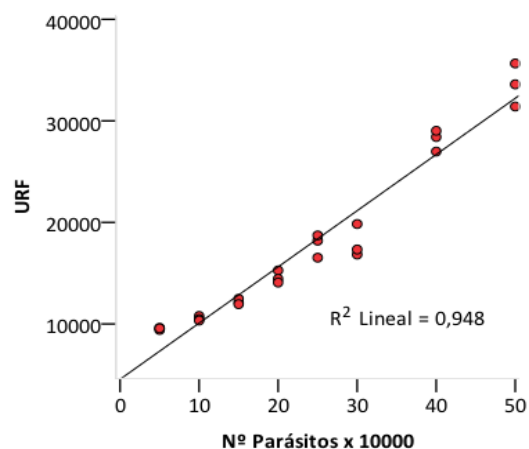


Fig. 50. Infección experimental: Correlación entre el número promastigotes recuperados *versus* intensidad de fluorescencia (URF).

El éxito del protocolo de infección con diferentes suspensiones de promastigotes, y la recuperación de promastigotes, fue cuantificado mediante el método fluorimétrico de reducción de la resazurina como se observa en la Fig. 50. La infección con diferentes suspensiones de promastigotes muestra una correlación directa entre el número de promastigotes recuperados y las unidades relativas de fluorescencia ($R^2 = 0,948$).

VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE CRIBADO *IN VITRO*.

Con el propósito de validar un método simple y confiable para el cribado farmacológico, entre los métodos colorimétricos, se ha seleccionado el método fluorimétrico de la resazurina para comparar con el recuento directo por microscopía “*gold standar*”. Para la comparación de ambos métodos se ha utilizado el porcentaje de inhibición tras el efecto de un fármaco en relación al control, obtenido por recuento directo de parásitos al microscopio en el método directo y en unidades relativas de fluorescencia en el método fluorimétrico.

VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* SOBRE PROMASTIGOTES

Se determinó la actividad anti-*Leishmania* de la miltefosina y anfotericina B (AnB), sobre promastigotes de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. Los resultados se recogen en las Tablas 24 al 27.

Frente a *L. infantum*, los porcentajes de inhibición, determinados por recuento óptico y el método fluorimétrico, no presentan diferencias significativas en ambos fármacos ($p > 0,05$), siendo los coeficientes de variación mayores en el recuento directo (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento de *L. infantum* en la susceptibilidad *in vitro* a la miltefosina y la anB, determinado por el recuento óptico (RO) y el método fluorimétrico.

<i>L. infantum</i>					
[C] μg/mL	<i>Miltefosina</i>		[C] μg/mL	<i>Anfotericina B</i>	
	RO	Fluorimétrico		RO	Fluorimétrico
	% Inhibición ±DS	% Inhibición ±DS		% Inhibición ±DS	% Inhibición ±DS
100	100 ± 0,0	93,4 ± 0,4	5	100 ± 0,0	97,7 ± 0,1
50	99,7 ± 0,2	96,3 ± 3,6	2,5	100 ± 0,0	98,3 ± 0,1
25	98,8 ± 0,2	98,7 ± 0,1	1,25	100 ± 0,0	98,5 ± 0,2
12,5	70,8 ± 11,0	73,4 ± 1,6	0,63	100 ± 0,0	98,4 ± 0,1
6,25	47,1 ± 12,2	42,6 ± 5,8	0,31	99,7 ± 0,1	98,5 ± 0,2
3,13	13,1 ± 10,1	11,6 ± 4,3	0,16	99,1 ± 0,1	98,5 ± 0,1
1,56	8 ± 8,0	0,4 ± 1,9	0,08	79,6 ± 9,3	66,2 ± 0,5
0,78	-2,2 ± 13,7	-7,4 ± 8,1	0,04	9,8 ± 8,0	25,2 ± 2,0
IC ₅₀ a	5,78	6,6	IC ₅₀ a	0,07	0,05
IC ₅₀ b	8,07	7,18	IC ₅₀ b	0,06	0,05
IC ₅₀ c	6,84	7,79	IC ₅₀ c	0,06	0,05
Promedio	6,89 ± 1,15	7,19 ± 0,60	Promedio	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00
CV	16,65%	8,34%	CV	11,29%	1,19%

Tabla 25. Resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento de *L. amazonensis* en la susceptibilidad *in vitro* a la miltefosina y la anB, determinado por el recuento óptico (RO) y el método fluorimétrico.

<i>L. amazonensis</i>					
[C] μg/mL	<i>Miltefosina</i>		[C] μg/mL	<i>Anfotericina B</i>	
	RO	Fluorimétrico		RO	Fluorimétrico
	% Inhibición ±DS	% Inhibición ±DS		% Inhibición ±DS	% Inhibición ±DS
100	100 ± 0,0	98 ± 0,4	5	100 ± 0,0	98,8 ± 0,1
50	99,6 ± 0,1	98,9 ± 0,0	2,5	100 ± 0,0	98,7 ± 0,0
25	78,4 ± 10,5	98,9 ± 0,1	1,25	99,9 ± 0,1	98,6 ± 0,1
12,5	48,6 ± 11,2	66,6 ± 2,6	0,63	99,4 ± 0,2	98,8 ± 0,1
6,25	26,9 ± 14,6	30,6 ± 2,2	0,31	97,7 ± 0,3	98,9 ± 0,1
3,13	9,3 ± 9,6	-1,1 ± 0,4	0,16	99,7 ± 0,1	99 ± 0,1
1,56	-1,4 ± 15,5	-2 ± 0,0	0,08	51,5 ± 13,4	74,1 ± 1,5
0,78	-11,3 ± 14,8	-2 ± 0,1	0,04	-6,1 ± 15,6	4,5 ± 0,6
IC ₅₀ a	9,46	8,98	IC ₅₀ a	0,07	0,06
IC ₅₀ b	8,75	9,2	IC ₅₀ b	0,08	0,06
IC ₅₀ c	12,49	9,52	IC ₅₀ c	0,09	0,06
Promedio	10,23 ± 1,99	9,23 ± 0,27	Promedio	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,00
CV	19,42%	2,98%	CV	11,73%	0,91%

A pesar de la elevada correlación entre ambos métodos, la IC₅₀ (µg/mL) obtenida en el cribado frente a la miltefosina exhibe rangos comprendidos entre 5,78 - 8,07 y 6,60-7,79, para el recuento directo y el método fluorimétrico, lo que significa que el método fluorimétrico presenta mayor precisión que el recuento directo. En cambio, la IC₅₀ (µg/mL) obtenida en el cribado frente a la AnB exhibe rangos comprendidos entre 0,06 - 0,07 y 0,05 - 0,05 para el recuento directo y el método fluorimétrico, respectivamente.

En la Tabla 25 se muestran los resultados de la actividad de la miltefosina y la AnB frente a promastigotes de *L. amazonensis*. Tampoco se muestran diferencias significativas en cuanto a los porcentajes de inhibición obtenidos por ambos métodos ($p > 0,05$). También se puede apreciar que el coeficiente de variación es mayor en el recuento directo.

Las IC₅₀ calculadas para la miltefosina están comprendidos en los rangos 8,75 – 12,49 y 8,98 – 9,52 (µg/mL) para el recuento directo y el método fluorimétrico, respectivamente. En cambio, para la anB los rangos son 0,07 – 0,09 y 0,06 – 0,06 para el recuento directo y el método fluorimétrico, respectivamente.

Siguiendo el mismo diseño experimental, en la Tabla 26 se muestran los resultados de la actividad de miltefosina y AnB frente a promastigotes de *L. braziliensis*. Los porcentajes de inhibición obtenidos en ambos fármacos no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$). También se puede destacar que el coeficiente de variación es mayor en el recuento óptico.

Las IC₅₀ calculadas para la miltefosina están comprendidas en los rangos 5,76 – 7,38 y 6,94 – 7,38 (µg/mL) para el recuento directo y el método fluorimétrico, respectivamente. En cambio, para la anB los rangos son 0,04 – 0,05 y 0,04 para el recuento óptico y el método fluorimétrico respectivamente.

Tabla 26. Resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento de *L. braziliensis* en la susceptibilidad *in vitro* a la miltefosina y la anB, determinado por el recuento óptico (RO) y el método fluorimétrico.

<i>L. braziliensis</i>					
[C] μg/mL	<i>Miltefosina</i>		[C] μg/mL	<i>Anfotericina B</i>	
	RO	Fluorimétrico		RO	Fluorimétrico
	% Inhibición ±DS	% Inhibición ±DS		% Inhibición ±DS	% Inhibición ±DS
100	100 ± 0,0	94,6 ± 1,6	5	100 ± 0,0	95,5 ± 0,2
50	99,8 ± 0,1	96,5 ± 0,1	2,5	100 ± 0,0	96,6 ± 0,0
25	98,9 ± 0,2	97,3 ± 0,0	1,25	100 ± 0,0	96,9 ± 0,1
12,5	70,1 ± 8,4	96,9 ± 0,1	0,63	100 ± 0,0	97,3 ± 0,2
6,25	49,7 ± 10,7	43,9 ± 1,4	0,31	100 ± 0,0	97,2 ± 0,1
3,13	16 ± 5,0	-2,1 ± 4,3	0,16	99,5 ± 0,2	97,6 ± 0,1
1,56	-0,9 ± 16,7	-8,8 ± 4,0	0,08	87 ± 8,1	89,1 ± 0,2
0,78	0,5 ± 22,6	-6,7 ± 2,9	0,04	32,2 ± 12,7	13,3 ± 1,2
IC ₅₀ a	7,38	6,94	IC ₅₀ a	0,05	0,04
IC ₅₀ b	5,76	7,38	IC ₅₀ b	0,04	0,04
IC ₅₀ c	7,04	7,18	IC ₅₀ c	0,05	0,04
Promedio	6,73 ± 0,85	7,16 ± 0,22	Promedio	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
CV	12,70%	3,05%	CV	9,53%	1,57%

Tabla 27. Resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento de *L. guyanensis* en la susceptibilidad *in vitro* a la miltefosina y la anB, determinado por el recuento óptico (RO) y el método fluorimétrico.

<i>L. guyanensis</i>					
[C] μg/mL	<i>Miltefosina</i>		[C] μg/mL	<i>Anfotericina B</i>	
	RO	Fluorimétrico		RO	Fluorimétrico
	% Inhibición ±DS	% Inhibición ±DS		% Inhibición ±DS	% Inhibición ±DS
100	100 ± 0,0	99,5 ± 0,3	5	100 ± 0,0	97,6 ± 0,1
50	100 ± 0,0	98,1 ± 0,4	2,5	100 ± 0,0	98,1 ± 0,0
25	98,5 ± 0,1	92,9 ± 8,8	1,25	100 ± 0,0	98,2 ± 0,0
12,5	77 ± 8,0	76 ± 1,5	0,63	100 ± 0,0	98,3 ± 0,1
6,25	49,8 ± 10,4	54,1 ± 1,5	0,31	99,9 ± 0,1	98,4 ± 0,2
3,13	27,3 ± 9,8	12,7 ± 2,9	0,16	96,3 ± 0,9	98,8 ± 0,2
1,56	4,7 ± 15,3	4,6 ± 3,5	0,08	86,7 ± 5,1	73,4 ± 0,1
0,78	-2,3 ± 16,3	3,8 ± 5,6	0,04	30 ± 9,3	25,3 ± 1,3
IC ₅₀ a	4,71	7,24	IC ₅₀ a	0,045	0,043
IC ₅₀ b	6,12	6,58	IC ₅₀ b	0,053	0,043
IC ₅₀ c	5,81	6,73	IC ₅₀ c	0,049	0,042
Promedio	5,55 ± 0,74	6,85 ± 0,35	Promedio	0,049 ± 0,004	0,043 ± 0,0006
CV	13,37	5,06	CV	8,16	1,35

Por último, en la Tabla 27 se muestran los resultados de la actividad de miltefosina y AnB frente a promastigotes de *L. guyanensis*. Los porcentajes de inhibición obtenidos en ambos fármacos no presentan diferencias significativas entre ambos métodos ($p > 0,05$).

Las IC_{50} calculadas para la miltefosina están comprendidas en los rangos 4,71 – 6,12 y 6,58 – 7,24 para el recuento directo y el método fluorimétrico, respectivamente, mientras que, para la anB están entre 0,045 – 0,053 y 0,042 – 0,043 para el recuento óptico y el método fluorimétrico, respectivamente.

VALORACION DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* SOBRE AMASTIGOTES INTRACELULARES

Para evaluar los resultados obtenidos del método fluorimétrico en comparación al recuento directo, se determinó la actividad leishmanicida de la miltefosina y la fungizona®. Se optó por la Fungizona® debido a que la anB (Sigma®) resultó más tóxica para las células J774 (ver capítulo III).

Los resultados calculados del porcentaje de inhibición, IC_{50} y CV de tres experimentos independientes se recogen en las Tablas 28 y 29, y en las Fig. 51 y 52, se representan las curvas obtenidas por regresión multinomial, en respuesta a la susceptibilidad de los amastigotes intracelulares frente a la Fungizona® y miltefosina, evaluados mediante el método fluorimétrico y el recuento directo. Se puede evidenciar la alta correlación entre ambos métodos. Los valores calculados de la IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de tres experimentos independientes, están comprendidos en el rango de 0,19 – 0,64 y 0,37 – 0,62 para la fungizona y 2,72 – 7,42 y 3,74 – 5,93 para la miltefosina, para el recuento directo y el método fluorimétrico, respectivamente. El método fluorimétrico muestra mayor precisión y exactitud que el recuento directo, debido a que este último presenta desviaciones estándar y coeficientes de variación elevados.

[C] µg/mL	Fungizona®	
	RO % Inhibición SD	Fluorimétrico % Inhibición SD
10,00	96,3 ±4,8	100,1 ±0,2
5,00	98,7 ±1,5	100,0 ±0,0
2,50	96,9 ±3,8	93,7 ±3,0
1,25	89,7 ±10,1	83,5 ±9,7
0,63	78,2 ±17,5	82,1 ±5,2
0,31	48,8 ±18,4	28,3 ±15,0
0,16	17,9 ±20,1	0,4 ±0,7
0,08	6,3 ±10,9	0,1 ±0,1
IC ₅₀ a	0,193	0,373
IC ₅₀ b	0,363	0,536
IC ₅₀ c	0,643	0,617
Media	0,40±0,23	0,51±0,12
CV	56,85	24,43

Tabla 28. Porcentaje de inhibición obtenidos mediante el método fluorimétrico y el recuento óptico (RO), en la susceptibilidad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* frente a la Fungizona®; resultados de la IC₅₀ y el Coeficiente de variación (CV); concentración [C].

[C] µg/mL	Miltefosina	
	RO % Inhibición SD	Fluorimétrico % Inhibición SD
50,00	99,5 ±0,3	100,0 ±0,0
25,00	97,8 ±1,3	95,2 ±4,2
12,50	74,1 ±16,1	87,6 ±6,3
6,25	53,6 ±28,5	62,0 ±12,4
3,13	30,1 ±24,2	31,5 ±9,2
1,56	17,2 ±22,2	7,0 ±12,2
0,78	1,6 ±2,8	7,0 ±12,2
0,39	5,3 ±6,9	3,8 ±6,5
IC ₅₀ a	7,421	4,355
IC ₅₀ b	6,328	5,932
IC ₅₀ c	2,721	3,745
Media	5,49±2,46	4,68±1,13
CV	44,8	24,1

Tabla 29. Porcentaje de inhibición obtenidos mediante el método fluorimétrico y el recuento óptico (RO), en la susceptibilidad *in vitro* sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* frente a la miltefosina; resultados de la IC₅₀ y el Coeficiente de variación (CV); concentración [C].

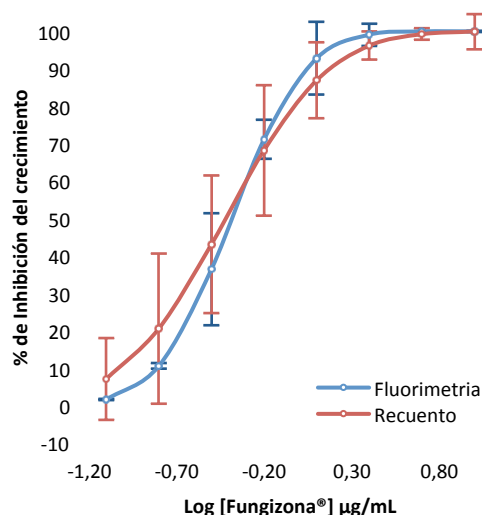


Fig. 51. Correlación multinomial entre el método fluorimétrico y recuento óptico, en la susceptibilidad *in vitro* de amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* a la fungizona®.

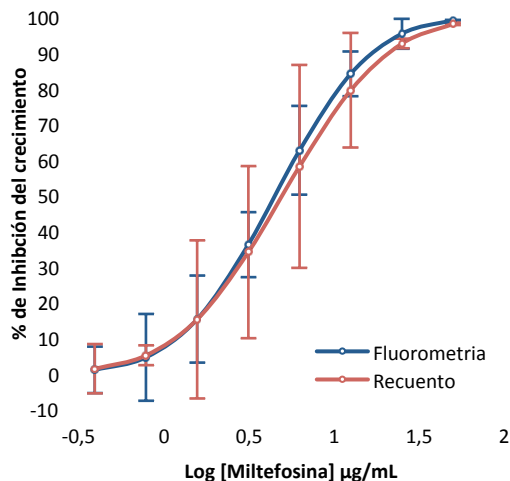


Fig. 52. Correlación multinomial entre el método fluorimétrico y recuento óptico, en la susceptibilidad *in vitro* de amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* a la miltefosina.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La evaluación de la susceptibilidad y la búsqueda de nuevos compuestos con actividad leishmanicida debe seguir procedimientos estandarizados y validados, tanto para los ensayos *in vitro* frente a formas promastigotes, como a las formas amastigotes intracelulares. En este contexto, hemos considerado que la modificación de las condiciones de trabajo incide directamente en los resultados obtenidos, por lo que el paso inicial en la selección del medio de cultivo es fundamental en la obtención de resultados fiables.

Diferentes medios nutritivos han sido propuestos para el cultivo de *Leishmania*, siendo el medio bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) el más difundido y utilizado para el aislamiento a partir de muestras clínicas y el mantenimiento en cultivos (Nicolle & Laveran 1908; Schuster & Sullivan 2002); otros estudios recomiendan el medio bifásico B-M199 para la obtención de promastigotes metacíclicos infectantes (Dey et al. 2002). En cambio otros autores recomiendan medios líquidos como el medio *Dulbecco's MEM* (Iovannisci & Ullman 1983), medio *M199* (McCarthy-Burke et al. 1991) y medio *Schneider's Drosophila Medium (SDM)* (Hendricks & Wright 1979; Howard et al. 1991), para el mantenimiento prolongado de cultivos axénicos *in vitro*. Hay que tener en cuenta que los medios bifásicos NNN y B-M199, por su composición, no son recomendados para determinar la viabilidad en la susceptibilidad en el cribado farmacológico. Por otro lado la composición descrita de los medios D-MEM y M199 requieren altas concentraciones de Suero Bovino Fetal (30%), que encarecen sustancialmente el desarrollo del trabajo. Por lo que para este estudio hemos seleccionado el medio de cultivo *Schneider Insect Medium* suplementado con 10% de SBF, 0,4% de Hepes, 0,04% de NaHCO₃, 1,5% de orina humana y antibióticos para el mantenimiento de los aislados bolivianos y de cepas de referencia de diferentes especies de *Leishmania* del Nuevo mundo (Dea-Ayuela et al. 2006).

Después del período de adaptación se procedió a determinar el patrón de crecimiento *in vitro*, mediante la curva de viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* y *L. infantum*. Los resultados de la curva de viabilidad de cada especie de *Leishmania* demostraron reproducibilidad y estabilidad en todos los experimentos realizados. También nos permitió identificar claramente las distintas fases en la curva de crecimiento: fase de adaptación (24 horas), fase de crecimiento exponencial (desde las 24 hasta las 96 horas que en *L. amazonensis* se prolonga hasta las 120 horas), fase estacionaria (hasta las 168 horas) y finalmente se continua con la fase de decaimiento hasta después del décimo día.

Al igual que en nuestro trabajo, otros autores describieron que la fase de crecimiento logarítmico de promastigotes de *L. amazonensis* se inicia después de las 24 horas y puede extenderse hasta las 100 horas (Hodgkinson et al. 1996) y una característica destacable, descrita por Wheeler y colaboradores, es que durante esta fase se pueden evidenciar las distintas formas morfológicas de los promastigotes de *L. mexicana* (Wheeler et al. 2011), remarcando su utilidad en experimentos biológicos y moleculares.

Otra fase de importancia en la curva de crecimiento, es la fase de decaimiento exponencial que es la culminación de una serie de cambios fisiológicos y morfológicos de los promastigotes de *Leishmania* con formación de los promastigotes metacíclicos, que son responsables de la infección en los hospedadores vertebrados (Sacks & Perkins 1984). Entre las características morfológicas de los promastigotes metacíclicos, cabe destacar la presencia de un cuerpo pequeño y ovoide con un flagelo muy largo y movimientos ondulatorios multidireccionales. Al igual que en este trabajo, otros estudios determinaron que la metaciclogénesis ocurre en la fase tardía del cultivo, de forma que la ausencia de nutrientes, seguida de la acidificación natural del medio de cultivo, serían determinantes para esta formación (Sacks & Perkins 1984; Bates & Tetley 1993; Hodgkinson et al. 1996; da Luz et al. 2009). Recientemente se ha demostrado

que la ausencia de purinas es fundamental para promover la metacicloogénesis de los promastigotes de *Leishmania mexicana* (Serafim et al. 2012). Acorde a nuestros resultados podemos decir que el medio de cultivo Schneider es capaz de promover las características biológicas básicas de los promastigotes de *Leishmania*, necesarias para la generación de las diferentes formas evolutivas y su infectividad (Bates 2007).

En la literatura se pueden encontrar múltiples opciones para evaluar la actividad leishmanicida *in vitro* frente a formas promastigote y amastigotes, que van desde el recuento microscópico directo a los métodos espectroscópicos (colorimétricos y fluorimétricos), los métodos moleculares (PCR cuantitativa y en tiempo real) o la citometría de flujo (Serenio et al. 2007). Todos ellos presentando ventajas y desventajas, por lo que hemos diseñado un protocolo para poner a punto un método simple, rápido, fiable, efectivo y de bajo coste para evaluar *in vitro* la susceptibilidad y la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas frente a formas promastigotes y amastigotes de *Leishmania*.

En la Tabla 30 presentamos un resumen comparativo que resume los resultados obtenidos del coeficiente de determinación lineal y la sensibilidad analítica de los métodos evaluados y los parámetros de sensibilidad y linealidad de los métodos espectroscópicos ensayados: colorimétricos (XTT y *p*-NPP) y fluorimétricos (Resazurina y SybrGreen).

Ambas herramientas, tanto colorimétricas como fluorimétricas, demostraron ser altamente lineales a diferentes concentraciones de sustrato y tiempo de incubación, con un coeficiente de determinación lineal superior al 0,99, tal y como se refleja en la Tabla 30. Únicamente en los ensayos con *p*-NPP y resazurina, la linealidad se vio afectada por el exceso de reacción del sustrato después de 3 y 4 horas de incubación, respectivamente. Por otro lado, la sensibilidad es variable entre los métodos y las horas de incubación.

Tabla 30. Resumen comparativo de resultados de la evaluación del coeficiente de determinación lineal (R^2) y la sensibilidad analítica (S) de los métodos colorimétricos (XTT y pNPP) y fluorimétricos (resazurina y SybrGreen); No determinado (Nd).

Horas	Colorimétricos				Fluorimétricos			
	R^2	S	R^2	S	R^2	S	R^2	S
	XTT 1mg		p-NPP 10mM		Resazurina 3 mM		SybrGreen 0,1%	
1	0,98951	768675	0,99943	16405	0,99919	295595	0,99908	27283
2	0,99533	903238	0,99267	15625	0,99926	18084	0,99930	167879
3	0,99667	<15625	0,99856	15625	0,99717	<15625	0,99945	123750
4	0,99580	<15625	0,99069	15625	0,85814	<15625	0,99937	149753
	XTT0,5 mg/mL		p-NPP 5mM		Resazurina 2,5 mM		SybrGreen 0,05%	
1	0,97209	16405	0,99524	59653	0,99937	100477	0,99759	195953
2	0,97073	<15625	0,99338	17803	0,99941	37527	0,99928	172436
3	0,99664	<15625	0,99874	62867	0,99689	30287	0,99992	127304
4	0,99871	<15625	0,99708	18843	0,85560	<15625	0,99978	116813
	XTT0,01 m/mL		p-NPP 1mM		Resazurina 2 mM		SybrGreen 0,01%	
1	Nd	Nd	0,99049	170516	0,99935	84897	0,99924	67615
2	Nd	Nd	0,99084	163895	0,99357	58164	0,99861	83867
3	Nd	Nd	0,99464	50916	0,99948	<15625	0,99934	52372
4	Nd	Nd	0,98201	<15625	0,82106	<15625	0,99810	76854

En concordancia con nuestros resultados, estudios previos describieron en *L. mexicana* un coeficiente de correlación lineal (R) de 0,965 entre el recuento directo y la densidad óptica de la sal XTT a 1 mg/mL (Williams et al. 2003). Otras aplicaciones en la evaluación de la viabilidad celular en células cancerígenas, determinaron un (R) mayor a 0,76 a 1 mg/mL de XTT después de 4 horas de incubación (Scudiero et al. 1988) y en la determinación de la actividad bactericida frente a enterobacterias el (R) fue superior a 0,985 a la concentración de 0,5 mg/mL de XTT (Stevens & Olsen 1993).

En los ensayos con pNPP, el coeficiente de determinación lineal fue mayor a 0,99 a diferentes tiempos de lectura. Asimismo, otros estudios también obtienen un coeficiente de determinación lineal (R) superior a 0,99 a 5mM de pNPP en la evaluación frente a promastigotes de *L. amazonensis* y *L. donovani* (Bodley et al. 1995; Montalvo et al. 2000).

En nuestros ensayos con resazurina el coeficiente de determinación lineal (R^2) fue superior a 0,99 hasta las 3 horas, después el R^2 disminuyó a 0,82 – 0,85 para

las diferentes concentraciones de resazurina. Diversos estudios han sido realizados con la forma comercial de la resazurina, denominada Alamar blue®, en los que se ha evaluado el (R^2) frente a promastigotes de *L. donovani*, durante períodos de incubación de 3, 9 y 24 horas, siendo de 0,997, 0,908 y 0,985, respectivamente (Shimony & Jaffe 2008). Es importante mencionar que la forma comercial Alamar blue® contiene un estabilizante que ralentiza la velocidad de reacción a diferencia de la resazurina (O'Brien et al. 2000). Al igual que nuestros resultados con la resazurina, otros trabajos también determinaron la equivalencia entre la señal de fluorescencia de reducción de la resazurina y el número de parásitos, siendo el (R) mayor a 0,99 frente a promastigotes de *L. donovani* y *L. major* (Siqueira-Neto et al. 2010).

Finalmente, los ensayos para determinar la correlación lineal entre el número de promastigotes y las unidades relativas de fluorescencia determinados (URF) mediante el SybrGreen presentaron un excelente R^2 (0,997 – 0,999). No se ha descrito su aplicación para la determinación de la actividad leishmanicida, sin embargo es ampliamente utilizado en la búsqueda de compuestos antimaláricos. En estudios previos frente a *P. falciparum* se determinó que el R^2 entre el porcentaje de parasitemia y la URF era de 0,9763 (Smilkstein et al. 2004). También, en otros estudios con *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica* la correlación lineal entre el número de parásitos y la intensidad de fluorescencia, presentó un R^2 de 0,957 y 0,9526, respectivamente (Downey et al. 2009).

A pesar de la alta correlación lineal y sensibilidad que ofrecen todos estos métodos, la principal desventaja de los métodos *p*-NPP y SybrGreen es que requieren más de dos pasos para su resolución, en cambio los métodos XTT y resazurina son directos y pueden ser aplicados en un solo paso. De estos 2 últimos, el método colorimétrico XTT puede generar una falsa densidad óptica cuando se evalúan compuestos coloreados en el rango de la longitud de onda, en cambio la emisión de fluorescencia del método fluorimétrico de la resazurina no se ve afectada por esta variable, directamente dependiente del compuesto. Por

lo que en los siguientes experimentos aplicaremos su utilidad en la evaluación de la susceptibilidad y el cribado farmacológico, tanto en promastigotes como en amastigotes intracelulares.

En la literatura se pueden encontrar diferentes modelos *in vitro* para determinar la actividad leishmanicida. Todos ellos ampliamente utilizados, tanto en la determinación de la susceptibilidad a los fármacos de referencia, como en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad leishmanicida. Sin embargo, hemos observado que los resultados notificados por los diferentes autores son muy variables, tal y como se puede apreciar en la Tabla 31. Estas discrepancias podrían deberse a diversos factores, como la cepa de *Leishmania*, el medio de cultivo y la metodología de trabajo aplicada. En todo caso, cada especie de *Leishmania* tiene características bioquímicas y moleculares específicas, por lo que responderán de forma independiente a un determinado compuesto o fármaco. Estas diferencias entre las especies del género *Leishmania* también se observan en la susceptibilidad a los fármacos de referencia y en aquellos que se encuentran en fase experimental (Croft et al. 2002); por ejemplo frente a los antimoniales pentavalentes (Grogl et al. 1992), a la paromomicina (Neal et al. 1995) y a la miltefosina (Escobar et al. 2002; Ganguly et al. 2006). El conocimiento de la susceptibilidad de cada especie a los fármacos de referencia es fundamental, ya que tiene implicaciones clínicas en la terapéutica de la leishmaniosis (Navin et al. 1992; Escobar et al. 2002).

Con estos antecedentes, y con la finalidad de comparar la variabilidad de la susceptibilidad *in vitro*, entre métodos y especies de *Leishmania*, hemos evaluado la susceptibilidad de 4 especies de *Leishmania* frente a la anB y la miltefosina, mediante el método de recuento directo (considerado como la técnica “gold standar”) y el método fluorimétrico de la resazurina. El análisis de los resultados, evidenció que existía una buena correlación entre ambos métodos y los resultados no presentaban diferencias significativas. En consecuencia, el método fluorimétrico de reducción de la resazurina es un

indicador efectivo para la determinación de la actividad leishmanicida, tal y como indican otros estudios (Shimony & Jaffe 2008; Toté et al. 2009; Siqueira-Neto et al. 2010; Corral et al. 2013).

Para facilitar la comprensión de la variación en la susceptibilidad determinada previamente mediante distintas técnicas, hemos diseñado un cuadro comparativo con los resultados obtenidos por otros autores (Tabla 31). Nuestros resultados obtenidos mediante el método fluorimétrico de reducción de la resazurina nos permitieron establecer el rango de susceptibilidad a la anB (expresado en IC_{50}) de *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* entre 0,04 y 0,06 $\mu\text{g/mL}$, lo que concuerda plenamente con los resultados comunicados por otros que también ensayaron a 48 horas (Ganguly et al. 2006). Sin embargo, otros autores señalan resultados de IC_{50} mucho más variables entre las especies, en un rango de 0,02 y 0,9 $\mu\text{g/mL}$ (Mikus & Steverding 2000). También mediante el método de la resazurina se determinó que la IC_{50} de *L. donovani* era de 0,65 $\mu\text{g/mL}$ (Vermeersch et al. 2009). Aunque no existe gran variación entre los resultados obtenidos a 48 y 72 horas (Escobar et al. 2002), es importante recordar que las condiciones de laboratorio, el tiempo en cultivo de la cepa y la preparación de los compuestos son determinantes en la variación de los resultados.

Frente a la miltefosina, las cuatro especies evaluadas fueron mucho más divergentes entre sí. Estas divergencias en la susceptibilidad también han sido citadas por otras investigaciones (Escobar et al. 2002; Yardley et al. 2005; Ganguly et al. 2006; da Luz et al. 2009).

Nuestros resultados frente a *L. braziliensis* presentan un IC_{50} de 7,16 $\mu\text{g/mL}$, que es similar a los resultados publicados por otros autores (IC_{50} 7,13 y 5,29 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), (Ganguly et al. 2006; Cabrera-Serra et al. 2007). En cambio la susceptibilidad de *L. infantum* y *L. amazonensis* (IC_{50} 7,16 y 9,23 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) son completamente divergentes a los resultados encontrados en la literatura (IC_{50} 6,32 – 0,45 y 4,99 – 3,59 respectivamente) (Ganguly et al.

2006; Cabrera-Serra et al. 2007). Finalmente, en *L. guyanensis* la IC₅₀ fue de 6,85 µg/mL. Es comprensible la variación en la susceptibilidad dado que pueden ocurrir variaciones significativas entre aislados de una misma especie (Yardley et al. 2005).

Tabla 31. Cuadro comparativo de la susceptibilidad *in vitro* frente a formas promastigote.

Especie	IC ₅₀				Tiempo	Método	Referencia
	Anfotericina B µg/mL	µM	Miltefosina µg/mL	µM			
<i>L. major</i>	3,604	3,900	1,916	4,70	48h.	Rz/Flu	(Siqueira-Neto et al. 2010)
<i>L. donovani</i>	1,201	1,300	1,100	2,70			
<i>L. tropica</i>	0,043	0,047	7,336	18,00			
<i>L. major</i>	0,033	0,036	4,687	11,50			
<i>L. donovani</i>	0,008	0,009	7,132	17,50	48h.	MTS/Col	(Ganguly et al. 2006)
<i>L. infantum</i>	0,039	0,042	6,317	15,50			
<i>L. amazonensis</i>	0,052	0,056	4,993	12,25			
<i>L. mexicana</i>	0,053	0,058	11,208	27,50			
<i>L. braziliensis</i>	0,056	0,061	7,132	17,50			
<i>L. major</i>	0,500	0,541	---	---	72h.	AB/Col	(Mikus & Steverding 2000)
	0,960	1,039	---	---			
<i>L. donovani</i>	0,020	0,022	---	---			
	0,280	0,303	---	---			
<i>L. amazonensis</i>	0,160	0,173	---	---			
	0,310	0,335	---	---			
<i>L. mexicana</i>	0,140	0,151	---	---			
<i>L. mexicana</i>	0,080	0,087	13,000	31,89	72h.	XTT/Col	(Williams et al. 2003)
	0,100	0,108	---	---			
<i>L. amazonensis</i>	0,21	0,230	---	---	72h.	XTT/Col	(Claudino et al. 2013)
<i>L. braziliensis</i>	1,2	1,300	---	---			
<i>L. donovani</i>	---	---	0,140	0,34	72h.	AB/Flu	(Orhan et al. 2006)
<i>L. chagasi</i>	1,9	2,056	---	---	72h.	MTT	(Braga et al. 2007)
<i>L. amazonensis</i>	0,9	0,974	---	---			
<i>L. major</i>	0,56	0,606	---	---	72h.	Rc	(Singh et al. 2012)
<i>L. donovani</i>	0,011	0,012	0,183	0,45	72 h	Rc	(Escobar et al. 2002)
	0,003	0,003	0,147	0,36			
<i>L. aethiopica</i>	0,102	0,110	1,125	2,76			
	0,221	0,239	0,473	1,16			

<i>L. tropica</i>	0,049	0,053	0,709	1,74			
	0,078	0,084	0,224	0,55			
<i>L. mexicana</i>	0,250	0,270	0,966	2,37			
	0,203	0,220	5,180	12,71			
<i>L. panamensis</i>	0,034	0,037	0,530	1,30			
	0,048	0,052	1,516	3,72			
<i>L. major</i>	0,040	0,043	5,339	13,1			
	0,037	0,040	1,956	4,80			
<i>L. donovani</i>	0,139	0,150	1,426	3,50	72 h	MTT/col	(Dutta et al. 2005)
	0,185	0,200	2,507	6,15			
<i>L. donovani</i>	0,647	0,700	3,512	3,80	72 h	Rz/Flu	(Vermeersch et al. 2009)
<i>L. braziliensis</i>	---	---	5,29	12,98			
<i>L. amazonensis</i>	---	---	3,59	8,81	72 h	AB/Col	(Cabrera-Serra et al. 2007)
<i>L. major</i>	---	---	0,41	1,01			
<i>L. infantum</i>	---	---	0,45	1,10			

Resazurina (Rz); sales de tetrazolio (MTT y MTS); sal soluble de tetrazolio (XTT); Alamar Blue® (AB); fluorimetría (Flu); colorimetría (Col); y recuento microscópico (Rc).

El siguiente estudio se realizó sobre el modelo *in vitro* de infección de macrófagos con *Leishmania*. Para este fin, el método debería simular la infección en el mamífero como estrategia más cercana en la búsqueda y selección de compuestos para el tratamiento de la leishmaniosis (Monte-Alegre et al. 2006). Las formas amastigotes intracelulares son lógicamente el objetivo más importante para la determinación de la actividad leishmanicida, pero los métodos descritos requieren un intenso trabajo y no son compatibles con la automatización. Entre los modelos *in vitro* que imitan el entorno de la fase de amastigotes intracelular más utilizados, están el uso de macrófagos derivados de peritoneo de ratones o monocitos humanos transformados en macrófagos. También se ha propuesto el uso de líneas celulares como las células J774, que fueron derivados de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (Handman 1990) y líneas celulares derivadas de monocitos humanos THP-1 (Gebre-Hiwot et al. 1992) y U937 (Martinez et al. 1988). En este trabajo hemos utilizado células J774

porque son fácilmente cultivables, bastante homogéneas y susceptibles de infección por *Leishmania*.

Continuando los procesos de validación, hemos evaluado la capacidad de infección experimental *in vitro* de macrófagos J774 con promastigotes de *L. amazonensis* como modelo. Después de diferentes ensayos, los resultados de las diferentes condiciones evaluadas, nos llevaron a seleccionar la relación 1/10 macrófago/promastigote, porque permite un recuento óptimo, adecuado y cuantificable en comparación a las relaciones superiores ensayadas, de forma que la susceptibilidad de infección de los macrófagos J774 superaba el 30% y el promedio de amastigotes por cada macrófago fue mayor a 18.

Del mismo modo, otros estudios determinaron la relación óptima de infección experimental *in vitro* de 1:10, cuando se utilizan macrófagos derivados de medula ósea frente a promastigotes de *L. major*, con un éxito de infección entre el 20% y 40% (Stenger & van Zandbergen 2011). Otro estudio también utilizó la relación 1:10 para la infección experimental *in vitro* de macrófagos derivados del peritoneo de ratones BALB/c con promastigotes de *L. donovani* (Dey et al. 2002). Otros estudios utilizaron la relación 1:8 para la infección de macrófagos derivados de medula ósea y macrófagos RAW 264.7 con *L. amazonensis*, con un éxito de infección del 70% y 60% respectivamente y una tasa de infección de 3 a 4 amastigotes por macrófago infectado. Entre sus observaciones también destaca que los promastigotes de *L. amazonensis* son capaces de inducir su propia autofagia (Cyrino et al. 2012).

Otro experimento previo a la introducción de los métodos de susceptibilidad y cribado farmacológico, fue la determinación de la lisis de macrófagos J774, que fue posible a concentraciones superiores a 0,006% de SDS en 200 µL de solución de lisis. La concentración mínima letal fue determinada por cuantificación de la actividad enzimática de las células viables, mediante la reducción de la resazurina y la exclusión de células vivas, por coloración de células inviables con azul trypan. Este procedimiento es ampliamente utilizado en la recuperación de

amastigotes intracelulares de *Leishmania*, y se han encontrado diferencias en la preparación de las soluciones y las concentraciones de SDS dependiendo del tipo de célula utilizada (Mauel et al. 1978; Mauel 1987; Kiderlen & Kaye 1990; Qi et al. 2004). El modelo de la lisis selectiva de macrófagos es también de gran valor en la recuperación de bacterias intracelulares como *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium avium* (Bermudez 1993).

En este trabajo, hemos incorporado un método semiautomatizado que nos permite determinar la viabilidad de las formas amastigotes intracelulares después del tratamiento con diferentes concentraciones de compuestos. Es un modelo *in vitro* basado en el ciclo biológico de *Leishmania* previamente descrito para evaluar la activación de macrófagos (Mauel 1987; Kiderlen & Kaye 1990)

La validación de este método ha sido corroborada por los resultados obtenidos mediante el recuento directo cuando se evaluó la susceptibilidad a la anB y miltefosina, existiendo una alta correlación entre ambos métodos y sin diferencias estadísticamente significativas. Además, el método fluorimétrico es más reproducible que el recuento directo, con coeficientes de variación menos dispersos. Recientemente Jain y colaboradores realizaron un experimento similar infectando células THP-1 con *Leishmania donovani* (Jain et al. 2012).

En la tabla 32 se resumen los resultados obtenidos por diferentes autores que utilizan diferentes metodologías para determinar la susceptibilidad leishmanicida en las formas amastigotes intracelulares, siendo aún más popular el recuento directo y la utilización de parásitos transfectados con marcadores colorimétricos y fluorescentes. Estos resultados, también reflejan diferencias en la susceptibilidad entre cepas de *Leishmania* e incluso entre diferentes células hospedadoras utilizadas para la infección.

Tabla 32. Cuadro comparativo de la susceptibilidad *in vitro* frente a formas amastigotes intracelulares

Especie	IC ₅₀				Célula	Ratio*	Tiempo	Método	Referencia
	AnB	Miltefosina							
	µg/mL	µM	µg/mL	µM					
<i>L. amazonensis</i>	---	---	1,310	3,21	MMPb	10:1	4hTI; 72hTT	Rc	(Morais-Teixeira et al. 2011)
<i>L. braziliensis</i>	---	---	2,200	5,40					
<i>L. guyanensis</i>	---	---	1,640	4,02					
<i>L. chagasi</i>	---	---	1,820	4,46					
<i>L. donovani</i>	---	---	0,090	0,22					
<i>L. major</i>	0,100	0,108	---	---	MMPc	10:1	24hTI; 96 TT	β-lactamasa	(Buckner & Wilson 2005)
<i>L. amazonensis</i>	0,110	0,119	---	---					
<i>L. donovani</i>	0,277	0,300	1,260	3,10	THP-1	50:1	24hTI; 96 TT	Rc computarizado	(Siqueira-Neto et al. 2012)
<i>L. amazonensis</i>	0,277	0,300	---	---					
<i>L. braziliensis</i>	0,259	0,280	---	---					
<i>L. major</i>	0,286	0,310	---	---					
<i>L. major</i>	0,111	0,120	0,232	0,57	MMPb	5:1	24hTI;	mCherry	(Calvo-Álvarez
<i>L. donovani</i>	0,033	0,036	1,859	4,56					
	0,046	0,050	1,353	3,32					
<i>L. aethiopica</i>	0,065	0,070	1,638	4,02					
	0,036	0,039	1,072	2,63					
<i>L. tropica</i>	0,046	0,050	2,372	5,82					
	0,083	0,090	4,169	10,23					
<i>L. mexicana</i>	0,129	0,140	2,784	6,83					
	0,111	0,120	4,125	10,12					
<i>L. panamensis</i>	0,074	0,080	4,332	10,63					
	0,120	0,130	4,332	10,63					
<i>L. major</i>	0,046	0,050	15,149	37,17					
	0,046	0,050	12,863	31,56					
<i>L. donovani</i>	0,277	0,300	0,285	0,7	MMPSwiss	15:1	24hTI; 120	Rc	(Vermeersch et
<i>L. donovani</i>	0,017	0,018	33,03	81,04	J774	5:1	24hTI;	Luc	(Gupta et al.
<i>L. donovani</i>	0,055	0,060	3,13	7,67	MMPc	7:1	24hTI; 72hTT	Rc	(Seifert et al. 2010)
	0,028	0,030	2,34	5,73					
	0,055	0,060	2,28	5,60	MMOb				
	0,018	0,020	1,06	2,60					
	0,120	0,130	2,23	5,46	THP-1				
	0,240	0,260	1,01	2,47					
	0,148	0,160	0,30	0,74	MPH				
	0,074	0,080	0,07	0,16					

Macrófagos derivados la cavidad peritoneal ratones BALB/c (MMPb); macrófagos derivados la cavidad peritoneal ratones CD1 (MMPc); macrófagos derivados de la medula ósea de ratones BALB/c (MMOb); Línea celular derivada de la leucemia monocítica aguda humana (THP-1); macrófagos derivados de sangre periférica de humanos (MPH); relación de promastigotes por macrófago (Ratio*); Tiempo de infección y de tratamiento (TI y TT respectivamente); recuento microscópico (Rc); transfectados con β-lactamasa colorimétrico (β-lactamasa); transfectados con mCherry fluorescente (mCherry); transfectados con Luciferasa fluorescente (Luc).

Al igual que en las formas promastigotes, las mayores diferencias se pueden observar frente a la miltefosina. Sin embargo, es de resaltar que tanto la anB como la miltefosina, exacerbaban su actividad frente a las formas amastigotes intracelulares. Esta particularidad fue previamente anotada por Berman y Wiler, quienes postularon que la capacidad de multiplicación de los promastigotes en los medios de cultivos les confería menor sensibilidad a los agentes leishmanicidas que los amastigotes intracelulares (Berman & Wyler 1980).

La introducción de micrométodos semiautomatizados para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad leishmanicida, así como para la determinación de la susceptibilidad en modelos *in vitro*, son muy ventajosas porque disminuyen sustancialmente la cantidad de trabajo, tiempo de ejecución y coste de producción en comparación con el método clásico. Estos métodos, en especial los realizados con amastigotes intracelulares, son altamente sensibles y reproducibles, lo que les convierte en candidatos idóneos para su adaptación al cribado farmacológico a gran escala.

CAPÍTULO III

BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS FRENTE A *LEISHMANIA*

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Cada vez más, las comunicaciones científicas describen nuevos fallos terapéuticos y la resistencia adquirida a los tratamientos convencionales frente a la leishmaniosis. Por otro lado, a pesar de que en la actualidad, las herramientas tecnológicas sean cada vez mejores, los esfuerzos realizados para el desarrollo de nuevas estrategias para combatir esta enfermedad no han conseguido una alternativa eficaz.

Entre las estrategias globales, está el desarrollo de una vacuna. Sin embargo, los resultados de los ensayos preclínicos realizados por algunos investigadores, no son esperanzadores. Por lo que en la actualidad, la estrategia alternativa, es la búsqueda de nuevos fármacos leishmanicidas. A ésta estrategia se suma el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas de los fármacos ya existentes, la síntesis química de nuevos compuestos y la búsqueda de metabolitos a partir de productos naturales.

En este capítulo se ha evaluado la susceptibilidad *in vitro* de aislados bolivianos de *Leishmania* a los tratamientos convencionales. Además, se ha determinado la actividad leishmanicida de nuevas formulaciones farmacéuticas de Anfotericina B (AnB), así como productos naturales derivados de plantas y compuestos de síntesis química.

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Evaluar *in vitro* la susceptibilidad de aislados bolivianos de *Leishmania* frente a AnB, miltefosina y al concentrado total de alcaloides de Evanta CAT-E8.
2. Determinar *in vitro* la actividad leishmanicida de diferentes estados de agregación de la AnB (monomérico, dimérico y poliagregado), libres y encapsulados en microesferas de albumina, además de una formulación

en gel de AnB monomérica en complejo de γ -ciclodextrinas frente a formas promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania spp.*

3. Determinar *in vitro* la actividad leishmanicida de extractos, fracciones y metabolitos de diferentes especies de *Piper spp.* frente a promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania spp.*
4. Determinar *in vitro* la actividad leishmanicida de derivados de sulfonamidas frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania spp.* e identificar los daños ultraestructurales sobre promastigotes de *L. infantum*.
5. Determinar *in vitro* la actividad leishmanicida de derivados de oxoisoaporfina frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania spp.*
6. Evaluar la eficacia *in vivo* de formulaciones en gel, pomada y crema de AnB en un modelo de leishmaniosis cutánea crónica en el criceto dorado.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS GENERALES

La preparación de resazurina 2,5 mM, el tampón PBS (1X), el medio Schneider y el medio RPMI-1640 han sido descritos detalladamente en el capítulo II.

LINEA CELULAR Y AISLADOS DE *LEISHMANIA*

Parásitos

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de referencia: *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN83) cedida por la Dra. Portús de la Universidad de Barcelona, *L. amazonensis* (MHOH/BR/79/MARIA), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. guyanensis* (141/93) cedidas por el Dr. Toraño del Instituto de Salud Carlos III de Madrid. Y además, se incluyeron 55 aislados de *Leishmania* obtenidos de pacientes bolivianos y caracterizadas previamente en el capítulo I de este trabajo.

Macrófagos

Se empleó la línea celular de macrófagos-J774, adquirida en el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (España). Esta línea fue derivada de células tumorales procedentes de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (Ralph & Nakoinz 1975).

COMPUESTOS

Entre los compuestos evaluados en el cribado farmacológico, se incluyeron formulaciones farmacéuticas, compuestos de síntesis química y productos naturales:

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Fueron realizadas por el equipo de investigación dirigido por el profesor Dr. Juan José Torrado del Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Estas formulaciones comprenden:

1. AnB Monomérica libre (ML)
2. AnB Monomérica encapsulada en microesferas de albúmina (MMA)
3. AnB Dimérica libre (DL)
4. AnB Dimérica encapsulada en microesferas de albúmina (DMA)
5. AnB Poliagregado libre (PL)
6. AnB Poliagregado encapsulado en microesferas de albúmina (PMA)
7. Gel de AnB monomérica en complejos de γ -ciclodextrinas (MGC)
8. Crema de AnB monomérica en complejos de γ -ciclodextrinas
9. Pomada de AnB monomérica en complejos de γ -ciclodextrinas

PRODUCTOS NATURALES

Fueron obtenidos a partir de plantas naturales por dos grupos de investigación. Los extractos, fracciones y metabolitos secundarios de *Piper delineatum*, *P. pseudoarboreum*, *P. divaricatum* y *P. heterophyllum*, así como de los frutos de *P. glabratum*, fueron obtenidos en colaboración con los grupos de investigación del I.I.F.B. de la Universidad Mayor de San Andrés de Bolivia, bajo la dirección de la Dra. Esther Flores y en el Instituto Universitario de Bio-orgánica “Antonio González” de la Universidad de la Laguna España, bajo la dirección de la Dra. Isabel López Bazzocchi.

COMPUESTOS DE SÍNTESIS QUÍMICA

Fueron sintetizados por 2 grupos de investigación en química médica.

1. Los derivados de sulfonamidas fueron sintetizados por el grupo de investigación dirigido por la Dra. Eugenia González Rosende del Departamento de Farmacia de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

2. Los derivados oxoisoaporfina fueron sintetizados por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Florencio M. Ubeira del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Las estructuras químicas de los metabolitos de *Piper spp.* y los compuestos de síntesis química se recogen en el anexo I.

Todos los compuestos, fueron disueltos en DMSO, a la concentración de 50 mg/mL, obteniéndose así una solución madre. A partir de la misma, se realizaron diluciones seriadas 1:2 (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13,1,56 y 0,78 $\mu\text{g/mL}$) para la evaluación de la actividad frente a *Leishmania*, por triplicado.

MÉTODOS

CULTIVOS DE PARÁSITOS Y DE MACRÓFAGOS-J774

El mantenimiento de los parásitos y los macrófagos-J774, se realizaron siguiendo los protocolos descritos en el capítulo II.

CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO* SOBRE PROMASTIGOTES

Para el cribado farmacológico, se ha seguido el método de la resazurina previamente validado en el capítulo II.

En microplacas (Costar®) de 96 pocillos se dispusieron 100 μL de los compuestos que previamente fueron preparados a diferentes concentraciones por triplicado. Después se añadieron 100 μL de una suspensión homogénea de promastigotes en fase de crecimiento logarítmico a una concentración de $1,25 \times 10^6$ parásitos/mL. En cada placa se incorporó un grupo de pocillos control de crecimiento que contenía la misma concentración de promastigotes que los pocillos tratados, en un volumen final de 200 μL de medio de cultivo. También se

preparó un grupo blanco que contenía únicamente 200 µL de medio de cultivo. Tras la adición de los compuestos, se incubaron a 26°C durante 48 horas.

Para el revelado se preparó una solución de resazurina 2,5 mM pH 7,2, de la que se añadieron 20 µL a cada pocillo, las placas se mantuvieron en incubación 3 horas y finalmente se determinaron las unidades relativas de fluorescencia (URF) en espectrofluorímetro (Infinite Tecan I-control) a 535_{ex} - 590_{em} nm de longitud de onda.

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (% IH) y la concentración inhibitoria media (IC₅₀) por el método de Regresión multinomial Probit utilizando el paquete estadístico SPSS v.20.0. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó de la siguiente forma:

$$\%IH = 100 - \frac{(URF \text{ tratado} - URF \text{ blanco } 1)}{(URF \text{ no tratado} - URF \text{ blanco})} \times 100$$

CITOTOXICIDAD CELULAR *IN VITRO* SOBRE MACRÓFAGOS-J774

A partir de un cultivo masivo de macrófagos-J774 en medio de cultivo RPMI con una viabilidad mayor al 95%, se preparó una suspensión homogénea de 5x10⁵ macrófagos/mL.

En microplacas de 96 pocillos se dispusieron 100 µL de la suspensión de macrófagos-J774 y se dejaron en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 2 horas. A continuación, se añadieron 100 µL de los compuestos previamente preparados mediante diluciones seriadas 1:2, por triplicado (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 y 0,78 µg/mL). En cada placa se incorporó el grupo control de crecimiento celular con la misma suspensión de macrófagos-J774. Además, se incorporó un grupo blanco que contenía únicamente 200 µL de medio de cultivo. Tras 24 h de incubación se añadieron 20

μL /pocillo de resazurina 2,5 mM, se continuó la incubación por 3 horas más y se determinaron las URF en espectrofluorímetro (Infinite Tecan I-control) a 535_{ex} - 590_{em} nm.

El porcentaje de inhibición del crecimiento y la concentración inhibitoria media (IC_{50}) fueron calculados de igual forma que en el punto anterior.

CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO* SOBRE AMASTIGOTES

Para el cribado farmacológico, se ha seguido el protocolo puesto a punto en el capítulo II. Se prepararon suspensiones homogéneas de macrófagos-J774 y promastigotes de *Leishmania* en fase estacionaria, a la concentración de 5×10^5 macrófagos/mL y 5×10^6 promastigotes/mL, respectivamente.

Primero se dispusieron 100 μL de la suspensión de macrófagos-J774 en cada pocillo de las microplacas, se dejó en incubación a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad durante 2 horas. Después se añadieron 100 μL de la suspensión de promastigotes, se dejó un grupo control de lisis sin infectar y se incubaron a 33°C con las mismas condiciones de aireación y humedad durante 24 horas; a continuación se subió la temperatura a 37°C y se continuo la incubación otras 24 horas más.

Después de 48 horas de infección y adaptación, se eliminó el sobrenadante y se realizaron lavados consecutivos con medio RPMI-HEPES hasta eliminar los promastigotes libres en el medio. A continuación, se añadieron 100 μL de medio de cultivo RPMI con diferentes concentraciones de los compuestos por triplicado, hasta un volumen final de 200 μL (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 $\mu\text{g/mL}$) y se dejaron en incubación durante 48 horas a 37°C . Paralelamente, se preparó una solución de lisis a una concentración de 0,006% de SDS y, tras descartar todo el sobrenadante de los pocillos de las microplacas, se añadieron 200 μL de solución de lisis. Se dejaron 20 minutos en agitación y se centrifugaron a 3.500 rpm durante 5 minutos a 4°C . Se descartó la solución de lisis y se

añadieron 200 μ L de medio Schneider. Finalmente, las placas fueron incubadas a 26°C durante 72 horas.

Para el revelado se preparó una solución de resazurina 2,5 mM, de la que se añadieron 20 μ L por cada pocillo. Las placas se mantuvieron en incubación durante 3 horas y finalmente se determinaron las URF en espectrofluorímetro (Infinite Tecan I-control) a 535_{ex} - 590_{em} nm.

El porcentaje de inhibición del crecimiento y la concentración inhibitoria media (IC₅₀) fueron calculados igual que en el cribado farmacológico frente a las formas promastigotes, con una variación, que en lugar del URF del blanco se utilizó el URF del control de lisis, sin infectar.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

REACTIVOS

- Solución A

NaHPO ₄ .H ₂ O	22,6 g
H ₂ O	c.s.p. 1 L

- Solución B

NaOH	25,2 g
H ₂ O	c.s.p. 1 L

- Tampón Milloning

Mezclar 58,1 mL de la solución A con 11,9 mL de la solución B y ajustar el pH a 7,2.

- Solución de Lavado

Tampón Milloning	45 mL
Glucosa (5,4%)	5 mL

- Solución de Fijado

Tampón Milloning	46 mL
Glutaraldehido 25%	4 mL
CaCl ₂ (1%)	0,5 mL

- Solución de Post-fijado

Tampón Milloning	100 mL
OsO ₄	1 g

- Acetato de Uranilo-Acetona

Acetona (70%)	50 mL
Acetato de Uranilo	1 g

- Acetato de Uranilo 1%

H ₂ Od	50 mL
Acetato de Uranilo	0,5 g

- Citrato de Plomo

A 30 mL de H₂Od caliente, añadir suavemente 1,33 g de Pb (NO₃)₂. Agitar suavemente y añadir 1,76 g de citrato de sodio, 8 mL de NaOH 1M y 50 mL de H₂Od.

- Azul de Toluidina 70%

Borax (1%)	100 mL
Azul de Toluidina	1 g

- Formvar 0,2%

Formvar	0,2 g
Cloroformo	100 mL

Mantener protegido de la luz.

- Mezcla plástica (Resina Spurr's)

VCD (4-Vinylcyclohexedene dioxide)	5 g
DER 766 (Batch Number 2236)	3 g
NSA (Nonenyl Succinic anhidride)	13 g
S-1 (N1-N dimethynolamine DMAE)	0,2 g

Mezclar por agitación suave

MÉTODOS

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El experimento fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Parasitología y el Servicio de Microscopia Electrónica de la Universidad Alcalá de Henares, supervisado por el Dr. Jorge Pérez Serrano.

Preparación de las muestras

Las muestras para la microscopía electrónica, fueron tratadas previamente con las concentración IC_{50} de compuestos que habían demostrado eficacia, de acuerdo al protocolo descrito en la sección del cribado farmacológico *in vitro* sobre promastigotes. Después de 48 horas de tratamiento, la suspensión se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4°C , a continuación se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 1 mL de la solución de lavado. El lavado se repitió dos veces más.

Fijación

Se eliminó el sobrenadante del lavado y a continuación se añadieron 500 μ L de la solución de fijado, se homogenizó la suspensión, por agitación intensa en vortex y se incubó a 26°C durante 1 hora.

Después, en la superficie de un cubreobjetos de 9 mm de diámetro, se dejó suavemente una gota de la suspensión fijada y se incubó nuevamente a 26°C durante 30 minutos, eliminándose finalmente el sobrenadante.

Deshidratación

Se prepararon diferentes soluciones de etanol al 30%, 50%, 70%, 90%, 95% y etanol absoluto, además de acetona anhidra.

La deshidratación fue un proceso gradual, de forma que las muestras se fueron pasando desde la menor concentración hasta llegar al etanol absoluto. Los cubreobjetos con las muestras fijadas fueron sumergidas en cada una de las soluciones de etanol durante 1 hora y finalmente en acetona anhidra. Para mantener la deshidratación, se conservaron en acetona anhidra hasta el montaje final.

Punto crítico

El punto crítico, es un proceso gradual de sustitución de la acetona anhidra por gas CO₂ en un secador de muestras (*Polaron, Critical Point Dryer*). Se dejaron las muestras a 31°C y 80 bar de presión hasta alcanzar el secado completo, durante aproximadamente durante 1 hora.

Montaje

Después del secado de las muestras, los cubreobjetos se montaron en soportes “Stub” para microscopía electrónica de barrido que contenían resinas de carbón adherente para fijar las muestras.

Metalizado

Las muestras montadas, se depositan en el metalizador (*Polaron*) y se hizo vacío con gas argón N48, a continuación se recubrieron con una fina capa de oro-paladio sobre la superficie de la muestras a 500 angstrom (Å) y 20 Kv, durante 150 segundos.

Observación

La observación microscópica fue realizada a 20 Kv en un microscopio electrónico de barrido digital Zeiss DSM-950.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Preparación de las muestras

El tratamiento inicial de las muestras con los compuestos activos se realizó de igual manera que para microscopía de barrido.

Fijación

Se eliminó el sobrenadante del lavado y a continuación se añadieron 500 µL de solución de fijado, se homogenizó la suspensión por agitación intensa en vortex y se incubó a 26°C, durante 1 hora. Tras centrifugar a 2.500 rpm, se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le añadió solución de lavado con CaCl₂ al 1% y se dejó toda la noche a 4°C.

Inclusión en agar

Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 minutos, y se eliminó el sobrenadante. Paralelamente, se fundió agar bacteriológico al 2% en tampón Milloning en microondas. Tras atemperar a 55°C se añadieron dos gotas de este agar al precipitado, se dejó solidificar a 4°C durante 1 hora y se añadió solución de lavado con CaCl₂ al 1%.

Post fijación

Se eliminó el sobrenadante y las muestras se dejaron embeber en solución de post fijado (tetra óxido de osmio al 1%), durante 90 minutos en oscuridad, a 4°C. Después se eliminó la solución de post fijado y se lavaron con tampón Milloning 4 veces.

Deshidratación

Se prepararon soluciones de acetona al 30%, 50%, 70%, 85%, 100% y acetona anhidra, además se preparó acetato de uranilo al 2% en acetona al 70%.

La deshidratación gradual, se realizó en ciclos de 30 minutos, que consistía en embeber las muestras en las distintas soluciones preparadas. Antes del paso de la solución al 70%, se añadió acetato de Uranilo al 2% y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se continuó con los ciclos de deshidratación hasta llegar a la acetona anhidra.

Inclusión en resina Spurr's

Primero se preparó la mezcla plástica básica, a partir de la cual se prepararon las siguientes concentraciones:

-Mezcla plástica al 25%

1 parte de la mezcla plástica

3 partes de acetona anhidra

-Mezcla plástica al 50%

2 partes de la mezcla plástica

2 partes de acetona anhidra

-Mezcla plástica al 75%

3 parte de Mezcla plástica

1 partes de acetona anhidra

Para continuar con la inclusión, se desechó la acetona anhidra de la muestra y, en ciclos de 70 minutos, se dejó embeber la mezcla plástica al 25%, 50%, 75% y 100%. Finalmente, se dejó embeber en mezcla plástica al 100% durante toda la noche a 4°C.

Polimerización en cápsulas

Al día siguiente, se descartó la mezcla plástica que se había dejado a 4°C y se añadió nueva mezcla plástica al 100%, dejándose embeber durante 70 minutos.

En capsulas de látex con fondo cónico se añadió una gota de mezcla plástica básica, en el fondo de éste, y se añadieron las muestras en resina Spurr's, evitando la formación de burbujas. Después de los 70 minutos, las muestras se depositaron en las cápsulas y se rellenaron completamente con la mezcla plástica. Se llevaron a la estufa de inclusión en seco (con sal de sílica), a 70°C durante 72 horas, para permitir la polimerización de la resina plástica.

Microtomía

Tallado de la resina plástica

Pasadas las 72 horas de polimerización, las muestras encapsuladas fueron llevadas al servicio de microscopía electrónica de la UAH para realizar el tallado. Se identificó la zona donde se encontraba la muestra y se talló en forma de una pirámide que permitía realizar los cortes gruesos.

Preparación de los cortes gruesos

Se prepararon las cuchillas de vidrio y con cinta de celofán, se formaron las "balsas" que fueron fijadas a las cuchillas con parafina. La cuchilla con la balsa fue montada en el soporte del ultra microtomo y la balsa fue rellenada con agua destilada hasta el tope máximo. Posteriormente, se montó la resina plástica previamente tallada en forma piramidal, y se realizaron los cortes gruesos de 0,5 a 0,7 μm , liberándolos en el agua que contenía la balsa. Estas finas películas fueron montadas en portaobjetos con una gota de agua, después se dejó secar el agua para que la muestra se fijara al portaobjetos y se realizó la tinción con azul de toluidina durante 5 minutos. Finalmente, se observó al microscopio para seleccionar la zona de interés.

Preparación de las rejillas

Se utilizaron rejillas de cobre de 3,05 mm de diámetro con 100 retículos que fueron recubiertos con una fina película de Formvar al 0,2%. Esta fina película de Formvar servirá de soporte para los cortes ultrafinos.

Preparación de los cortes finos

Continuando con la microtomía, se preparó la cuchilla de diamante y las balsas con cinta adhesiva cuyos bordes fueron impermeabilizados con parafina, se montó en el soporte del ultra microtomo y las balsas fueron rellenas con agua. A continuación, se realizaron los cortes ultra finos de 60 a 90 nm. Cuando los cortes reflejaron un color gris-plateado, en contraste con el agua, fueron capturados con las rejillas previamente preparadas.

Tinción positiva de los cortes ultrafinos

Los cortes ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, previamente preparados. Las rejillas con las muestras fueron embebidas por inmersión en solución de acetato de uranilo al 1% durante 20 minutos, después fueron lavados suavemente con agua destilada varias veces (mínimo 3 veces). A continuación, se preparó la solución de citrato de plomo en cajas Petri recubiertas con *parafilm*, y aireadas con pastillas de hidróxido de sodio. Las rejillas fueron sumergidas por inmersión en el citrato de plomo durante 3 minutos. Inmediatamente después las rejillas se lavaron con agua destilada varias veces, y se dejaron secar toda la noche.

Visualización al microscopio

Las rejillas fueron montadas en el soporte y visualizadas a 80 kV en un microscopio electrónico de transmisión *EM-10 Zeiss microscope*.

MODELO *IN VIVO* DE LEISHMANIOSIS CUTÁNEA CRÓNICA

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Tanto para el mantenimiento del parásito, como para las pruebas de eficacia se utilizaron lotes homogéneos de cricetos (*Mesocricetus auratus*) machos, de 60 - 70 g de peso. También, se emplearon lotes homogéneos de ratones BALB/c machos, de 6 a 8 semanas de edad. Todos ellos estuvieron alojados en jaulas Macrolón PANLAB-100, en estancias con temperatura, humedad y luz controladas.

MÉTODO

Siguiendo los modelos de leishmaniosis cutánea *in vivo* previamente propuestos por otros autores (Fournet et al. 1996; Peloi et al. 2011), hemos diseñado un protocolo *in vivo* para la evaluación de formulaciones farmacéuticas de AnB con variaciones. El desarrollo experimental está constituido por 3 períodos: 1) Infección experimental y establecimiento de la enfermedad, 2) período de tratamiento y 3) control post- tratamiento. Durante los 3 períodos, se realizó el seguimiento de la progresión de la lesión, mediante la determinación del diámetro de la inflamación con un calibrador (*Vernier, Caliper®*).

INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Para la infección experimental se emplearon promastigotes de *L. amazonensis* (MHOH/BR/79/MARIA) en fase estacionaria que correspondía a día 7 post-inoculo en medio de cultivo.

Se preparó una suspensión homogénea de $\sim 2 \times 10^8$ promastigotes/mL en solución estéril de PBS, y se inocularon $\sim 1 \times 10^7$ promastigotes en 50 μ L en la almohadilla plantar de la pata izquierda de los cricetos. La suspensión se mantuvo en un baño de hielo durante el proceso de infección. Esta técnica fue realizada por la Dra. M^a Auxiliadora Dea Ayuela, siguiendo los protocolos aprobados por la

Universidad Complutense de Madrid para la manipulación de animales de experimentación.

TRATAMIENTO

Después del establecimiento de la infección y para cada formulación a ensayar, los animales fueron distribuidos en 2 grupos: grupo 1) tratados con los compuestos y grupo 2) no tratados como control de la infección.

SEGUIMIENTO

La evaluación clínica de la infección, se determinó por la medida de la progresión de la inflamación con un calibrador (*Vernier, Caliper®*) de las patas infectadas en comparación con las patas no infectadas de los animales tratados y en comparación con los animales controles no tratados (Fournet et al. 1996).

RESULTADOS

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* A LOS FÁRMACOS DE REFERENCIA.

Los ensayos se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos mediante el método fluorimétrico descrito en el capítulo II. Se analizaron los aislados procedentes de Bolivia y que previamente fueron caracterizados en el capítulo I, además, se incluyeron cepas de referencia (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* y *L. infantum*). Todos los aislados fueron expuestos a diferentes concentraciones de Fungizona®, miltefosina y extractos de Evanta (que se emplea en el tratamiento tradicional de la leishmaniosis en Bolivia) . Se calculó el porcentaje de inhibición y la concentración inhibitoria media (IC₅₀). En las Tablas 33 al 35, se recogen los resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

Tabla 33. Resultados de la susceptibilidad *in vitro* de los aislados correspondientes al Complejo *L. (L.) mexicana* procedentes de Bolivia.

Especie	Código de aislado	IC ₅₀ (µg/ml) ± DS		
		Fungizona	Miltefosina	Evanta
<i>C. L. mexicana</i>	INL-001-10	0,41 ± 0,02	4,82 ± 0,08	9,36 ± 0,31
<i>C. L. mexicana</i>	INL-097-10	0,31 ± 0,01	1,16 ± 0,04	4,77 ± 0,30
<i>C. L. mexicana</i>	INL-153-10	0,54 ± 0,02	1,61 ± 0,09	7,08 ± 0,42
<i>C. L. mexicana</i>	INL-297-09	0,38 ± 0,05	4,94 ± 0,11	7,87 ± 0,28
<i>C. L. mexicana</i>	INL-298-09	0,52 ± 0,04	1,56 ± 0,08	3,38 ± 0,09
<i>C. L. mexicana</i>	INL-371-10	0,66 ± 0,03	5,73 ± 0,03	6,9 ± 0,10
<i>C. L. mexicana</i>	INL-377-10	0,38 ± 0,06	6,25 ± 0,27	6,16 ± 0,30
<i>C. L. mexicana</i>	INL-435-10	0,57 ± 0,01	1,83 ± 0,08	4,92 ± 0,05
<i>C. L. mexicana</i>	INL-465-10	0,45 ± 0,02	0,96 ± 0,01	4,45 ± 0,17
<i>C. L. mexicana</i>	INL-480-10	0,47 ± 0,01	1,49 ± 0,02	5,41 ± 0,06
<i>C. L. mexicana</i>	INL-FLA-09	0,41 ± 0,01	3,36 ± 0,11	7,95 ± 0,03
<i>C. L. mexicana</i>	INL-JTD-09	0,33 ± 0,05	2,55 ± 0,05	7,35 ± 0,08
<i>C. L. mexicana</i>	INL-560-10	0,53 ± 0,04	0,86 ± 0,04	3,61 ± 0,16
<i>C. L. mexicana</i>	INL-638-10	0,53 ± 0,04	1,34 ± 0,03	3,02 ± 0,10
<i>C. L. mexicana</i>	INL-255-10	0,34 ± 0,01	3,68 ± 0,11	8,87 ± 0,17
<i>L. amazonensis</i>	REF.: María	0,81 ± 0,05	12,44 ± 0,49	10,16 ± 0,37

Los valores representan el promedio de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) ± desviación estándar (DS) de tres experimentos. Cepa de referencia (REF).

Tabla 34. Resultados de la susceptibilidad *in vitro* de los aislados correspondientes a *L. (V.) braziliensis* procedentes de Bolivia.

Especie	Código de aislado	IC ₅₀ (µg/ml) ± DS		
		Fungizona	Miltefosina	Evanta
<i>L. braziliensis</i>	INL-011-10	0,44 ± 0,01	16,07 ± 1,18	11,81 ± 0,19
<i>L. braziliensis</i>	INL-012-10	0,84 ± 0,02	17,96 ± 0,43	13,34 ± 0,47
<i>L. braziliensis</i>	INL-065-10	0,66 ± 0,01	17,07 ± 0,54	10,95 ± 0,06
<i>L. braziliensis</i>	INL-329-10	0,41 ± 0,02	17,59 ± 0,63	12,53 ± 0,56
<i>L. braziliensis</i>	INL-386-10	0,28 ± 0,04	9,6 ± 0,28	8,85 ± 0,51
<i>L. braziliensis</i>	INL-413-10	0,64 ± 0,03	23,51 ± 0,37	15,62 ± 0,27
<i>L. braziliensis</i>	INL-414-10	0,28 ± 0,01	20,4 ± 0,38	11,33 ± 0,39
<i>L. braziliensis</i>	INL-448-10	0,53 ± 0,04	15,32 ± 0,51	6,84 ± 0,14
<i>L. braziliensis</i>	INL-452-10	0,8 ± 0,02	11,92 ± 0,64	12,5 ± 0,41
<i>L. braziliensis</i>	INL-466-10	0,48 ± 0,03	20,04 ± 0,45	9,01 ± 0,69
<i>L. braziliensis</i>	INL-471-10	0,48 ± 0,03	21,31 ± 0,50	8,84 ± 0,69
<i>L. braziliensis</i>	INL-485-10	0,33 ± 0,02	22,54 ± 0,11	5,55 ± 0,26
<i>L. braziliensis</i>	INL-503-10	0,47 ± 0,05	16,91 ± 0,50	8,36 ± 0,66
<i>L. braziliensis</i>	INL-554-10	0,51 ± 0,05	15,29 ± 1,05	5,74 ± 0,67
<i>L. braziliensis</i>	INL-582-10	0,48 ± 0,03	20,55 ± 0,64	9,96 ± 0,42
<i>L. braziliensis</i>	INL-002-10	0,32 ± 0,02	10,89 ± 0,43	12,68 ± 0,26
<i>L. braziliensis</i>	INL-051-10	0,46 ± 0,01	11,91 ± 0,59	9,11 ± 0,08
<i>L. braziliensis</i>	INL-213-10	0,3 ± 0,02	11,37 ± 1,10	6,25 ± 0,32
<i>L. braziliensis</i>	INL-264-10	0,54 ± 0,05	17,13 ± 0,56	9,49 ± 0,12
<i>L. braziliensis</i>	INL-366-10	0,22 ± 0,02	13,66 ± 0,71	10,24 ± 0,20
<i>L. braziliensis</i>	INL-412-10	0,3 ± 0,01	21,46 ± 0,45	7,89 ± 0,25
<i>L. braziliensis</i>	INL-436-10	0,42 ± 0,03	16,04 ± 0,11	9,15 ± 0,02
<i>L. braziliensis</i>	INL-459-10	0,42 ± 0,03	18,93 ± 1,14	5,39 ± 0,51
<i>L. braziliensis</i>	INL-464-10	0,31 ± 0,01	26,2 ± 1,38	5,29 ± 0,26
<i>L. braziliensis</i>	INL-474-10	0,35 ± 0,01	19,64 ± 0,37	7,17 ± 0,37
<i>L. braziliensis</i>	INL-481-10	0,36 ± 0,02	17,43 ± 1,37	6,67 ± 0,34
<i>L. braziliensis</i>	INL-483-09	0,83 ± 0,01	20,6 ± 0,44	14,2 ± 0,19
<i>L. braziliensis</i>	INL-484-10	0,35 ± 0,04	18,2 ± 1,28	4,67 ± 0,55
<i>L. braziliensis</i>	INL-505-10	0,29 ± 0,02	16,46 ± 0,40	6,5 ± 0,19
<i>L. braziliensis</i>	INL-518-10	0,64 ± 0,05	30,56 ± 0,80	11,96 ± 0,34
<i>L. braziliensis</i>	INL-522-10	0,38 ± 0,02	19,79 ± 1,31	5,2 ± 0,06
<i>L. braziliensis</i>	INL-524-10	0,36 ± 0,02	18,47 ± 1,21	4,27 ± 0,03
<i>L. braziliensis</i>	INL-606-10	0,61 ± 0,02	24,58 ± 0,58	11,85 ± 0,33
<i>L. braziliensis</i>	INL-626-10	0,4 ± 0,01	17,93 ± 1,56	8,19 ± 0,27
<i>L. braziliensis</i>	INL-367-10	0,68 ± 0,02	20,33 ± 0,43	18,21 ± 0,30
<i>L. braziliensis</i>	INL-415-10	0,2 ± 0,03	10,26 ± 0,59	2,63 ± 0,12
<i>L. braziliensis</i>	REF.: M2903	0,21 ± 0,01	7,28 ± 0,35	6,33 ± 0,32

Los valores representan el promedio de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) ± desviación estándar (DS) de tres experimentos. Cepa de referencia (REF).

Tabla 35. Resultados de la susceptibilidad *in vitro* de los aislados correspondientes a *L. (V.) lainsoni* procedentes de Bolivia.

Especie	Código de aislado	IC ₅₀ (µg/ml) ± DS		
		Fungizona	Miltefosina	Evanta
<i>L. lainsoni</i>	INL-296-10	0,93 ±0,02	7,71 ±0,15	7,86 ±0,20
<i>L. lainsoni</i>	INL-396-10	0,78 ±0,01	5,85 ±0,08	12,42 ±0,50
<i>L. lainsoni</i>	INL-540-10	0,34 ±0,02	3,35 ±0,12	10,9 ±0,05
<i>L. lainsoni</i>	IIFB-01-AS	0,56 ±0,07	3,13 ±0,21	8,7 ±0,35
<i>L. guyanensis</i>*	REF.: 141/93	0,23 ±0,03	7,42 ±0,25	11,48 ±0,83
<i>L. infantum</i>*	REF.: BCN83	0,46 ±0,03	7,65 ±0,32	5,63 ±0,65

Los valores representan el promedio de la concentración inhibitoria media (IC₅₀) ± desviación estándar (DS) de tres experimentos. Otras cepas de referencia (REF)*.

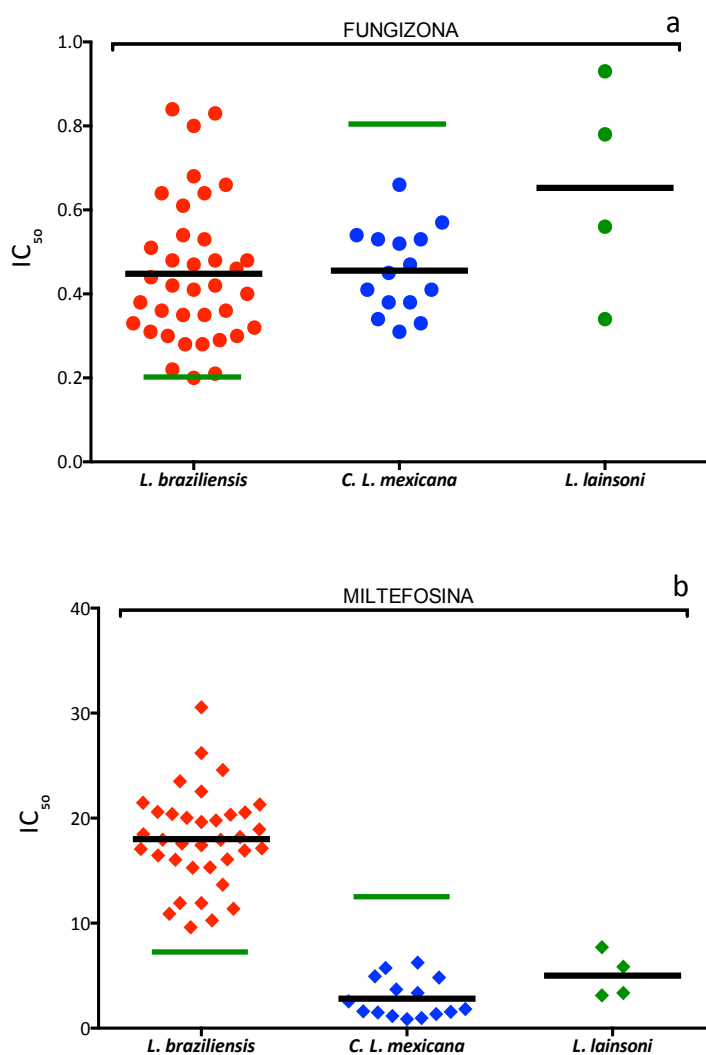
Los resultados obtenidos, muestran que todas las especies son altamente susceptibles a la Fungizona®, en cambio la susceptibilidad era muy variable frente a la miltefosina y Evanta. En la Fig. 53 se pueden observar los resultados de la sensibilidad de los aislados agrupados por especies.

En cuanto a la susceptibilidad a la Fungizona, el promedio de la IC₅₀ y el rango (mín – máx) de susceptibilidad de los aislados de *L. braziliensis* fue de 0,46 (0,2 – 0,8) µg/mL, para los aislados del Complejo *L. mexicana* también fue 0,46 (0,31 – 0,66) µg/mL, aunque con rango diferente, y para los aislados de *L. lainsoni* fue de 0,65 (0,34 – 0,93) µg/mL. Por otro lado, los aislados de referencia presentaron una IC₅₀ de 0,21 ± 0,01 para *L. braziliensis*; 0,81 ± 0,05 para *L. amazonensis*; 0,23 ± 0,03 para *L. guyanensis* y 0,46 ± 0,03 para *L. infantum* (Fig. 53: a).

En la susceptibilidad a la miltefosina, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre especies. Así, el promedio de la IC₅₀ y el rango (min – max), determinado de los aislados de *L. braziliensis* fue de 18,00 (9,60 – 30,56) µg/mL, que difería significativamente de los resultados obtenidos con los aislados, del Complejo *L. mexicana* 2,81 (0,86 – 6,25) µg/mL ($p < 0,01$) y con los de *L. lainsoni*, 5,01 (3,13 – 7,71) µg/mL ($p < 0,05$). Sin embargo, la susceptibilidad de los aislados de referencia presentaron un IC₅₀ promedio de

7,28± 0,35; 12,44± 0,49; 7,42± 0,25 y 7,65± 0,32 µg/mL para *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*, respectivamente (Fig. 53: b).

Frente a la Evanta, no se evidenciaron diferencias significativas entre especies, sin embargo los aislados del *C. L. mexicana* son más susceptibles que los de *L. braziliensis* y *L. lainsoni*. Así, el promedio de la IC₅₀ y el rango (min – max) de los aislados del Complejo *L. mexicana* fue 6,07 (3,02 – 9,36) µg/mL, en los de *L. braziliensis* fue de 9,12 (2,63 – 18,21) µg/mL, y para los aislados de *L. lainsoni* 9,97 (7,86 – 12,42) µg/mL. La susceptibilidad de los aislados de referencia las IC₅₀ fueron de 6,33 ±0,32; 10,16 ± 0,37; 11,48 ± 0,83 y 5,63 ± 0,65 µg/mL para *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*, respectivamente (Fig. 53: c).



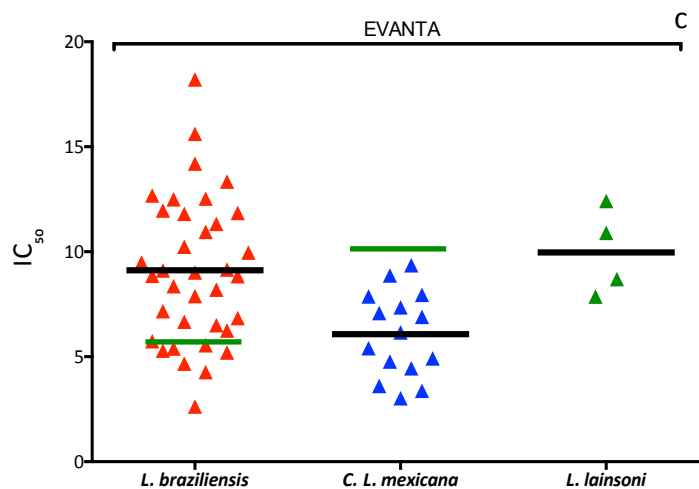


Fig. 53 (a, b y c). Variación de la susceptibilidad (IC_{50}) de los aislados de *Leishmania* a los fármacos de referencia; cepas de referencia (—); Promedio de los aislados (—).

CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO*

En este estudio se ha evaluado la actividad leishmanicida de formulaciones farmacéuticas, productos de plantas naturales y compuestos de síntesis química. La evaluación de la actividad leishmanicida inicialmente fue realizada frente a formas promastigote y los candidatos potencialmente activos fueron seleccionados para la evaluación en el modelo de infección *in vitro* sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania*. La metodología empleada fue validada y descrita ampliamente en el capítulo II. Adicionalmente se determinó la citotoxicidad sobre macrófagos J774 siguiendo protocolos previamente establecidos en nuestro laboratorio.

CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO* DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS DE ANFOTERICINA B

Actividad leishmanicida de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B frente a promastigotes de Leishmania.

En el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid se desarrollaron distintas formulaciones de anfotericina B (AnB). La caracterización de los 3 estados de agregación de la AnB (monomérico, dimérico y poliagregado), así como su formulación en microesferas de albumina sérica humana y su evaluación frente a *L. infantum*, ha sido descrita en estudios previos (Dea-Ayuela et al. 2004; Sanchez-Brunete et al. 2004; Ordoñez-Gutierrez et al. 2007).

En el presente trabajo se extiende a las cepas de referencia de las especies americanas, incluyendo además una nueva formulación en gel de AnB monómerica en complejos de γ -ciclodextrinas. También se incluyen en el estudio los fármacos de referencia (Fungizona® y el deoxicolato de AnB comercial (Sigma) para comparar con los estados de agregación.

En la Tabla 36 se recogen los resultados de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) y la citotoxicidad media (CC_{50}) de las formulaciones de AnB, frente a 4 especies de *Leishmania* y células J774, respectivamente.

El análisis comparativo entre las cuatro especies de *Leishmania*, no ha evidenciado diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Sin embargo, se puede apreciar claramente que *L. infantum* es más susceptible a todas las formulaciones, incluso a la Fungizona® y deoxicolato de AnB, utilizados como control de referencia.

Tabla 36. Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y citotoxicidad media (CC₅₀) de las formulaciones de AnB, frente a promastigotes de 4 especies de *Leishmania* y células J774.

Formulaciones	IC ₅₀ (µg/ml)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
ML	0,02 ± 0,008	0,13 ± 0,002	0,26 ± 0,078	0,06 ± 0,001	3,72 ± 0,387
MMA	0,24 ± 0,006	0,26 ± 0,004	0,46 ± 0,056	0,27 ± 0,017	3,98 ± 0,256
MGC	0,2 ± 0,001	0,37 ± 0,003	0,35 ± 0,006	0,21 ± 0,001	86,6 ± 3,670
DL	0,03 ± 0,001	0,12 ± 0,001	0,23 ± 0,011	0,03 ± 0,004	10,94 ± 1,704
DMA	0,09 ± 0,002	0,01 ± 0,002	0,1 ± 0,002	0,09 ± 0,003	9,86 ± 0,758
PL	0,34 ± 0,027	1,76 ± 0,175	2,33 ± 0,050	0,34 ± 0,012	43,48 ± 4,069
PMA	1,82 ± 0,011	1,35 ± 0,019	3,28 ± 0,045	0,56 ± 0,049	27,2 ± 0,311
Fgz	0,21 ± 0,011	0,23 ± 0,009	0,46 ± 0,021	0,46 ± 0,013	12,43 ± 1,372
AnB-D	0,034 ± 0,017	0,05 ± 0,006	0,06 ± 0,001	0,03 ± 0,003	4,52 ± 0,642

Monomérico libre (ML); monomérico encapsulado en microesferas de albúmina (MMA); gel de monomérico en complejos de γ -ciclodextrinas (MGC); dimérico libre (DL); dimérico encapsulado en microesferas de albúmina (DMA); poliagregado libre (PL); poliagregado encapsulado en microesferas de albúmina (PMA); Fungizona® (Fgz); deoxicolato de anfotericina B (AnB-D).

Un segundo análisis, esta vez para comparar la eficacia de las distintas formulaciones, demostró que las formulaciones monomérica y dimérica libre, monomérica y dimérica encapsuladas en microesferas de albúmina, y el monómero encapsulado en γ -ciclodextrinas, presentaban una eficacia comparable a la Fungizona® y el deoxicolato de AnB. En cambio el poliagregado libre y el poliagregado encapsulado en microesferas de albúmina, son menos eficaces que el deoxicolato de AnB y la Fungizona®, presentando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Mediante los ensayos de citotoxicidad, se ha determinado que la AnB monomérica, en sus estados libre y encapsulado en microesferas de albúmina junto al deoxicolato de AnB, son las más citotóxicas. En cambio la citotoxicidad se ve disminuida para la AnB dimérica, tanto libre como encapsulada en microesferas de albúmina o como Fungizona®. Sorprendentemente, la formulación de AnB monomérica en complejos de γ -ciclodextrinas junto a la AnB poliagregada, libre y encapsulada en microesferas son mucho menos citotóxicas que los anteriores ($p < 0,01$) (tabla 36).

Actividad leishmanicida de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B frente a amastigotes intracelulares.

En este apartado, se evaluó la actividad leishmanicida frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum*.

En la Tabla 37 se puede apreciar que las formulaciones encapsuladas en microesferas de albúmina incrementan notablemente su actividad leishmanicida frente a amastigotes intracelulares, en comparación con la actividad mostrada frente a promastigotes (Tabla 36), destacándose la AnB poliagregada en microesferas de albúmina frente a *L. (L.) amazonensis* ($p < 0,05$). En cambio la Fungizona® mantiene su actividad frente a *L. amazonensis* y es menos activa frente a *L. infantum*. Debemos resaltar que las formas amastigotes de *L. amazonensis* son más susceptibles a todas las formulaciones de AnB en comparación con las formas amastigotes de *L. infantum*, a excepción de la AnB poliagregado en microesferas de albúmina.

Tabla 37. Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de las formulaciones de AnB frente a amastigotes intracelulares *L. amazonensis* y *L. infantum*.

Formulaciones	IC ₅₀ (µg/mL)	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
ML	0,174 ± 0,004	0,22 ± 0,01
MMA	0,158 ± 0,008	0,164 ± 0,004
MGC	0,375 ± 0,032	0,499 ± 0,013
DL	0,086 ± 0,007	0,48 ± 0,05
DMA	0,04 ± 0,003	0,081 ± 0,003
PL	0,13 ± 0,010	0,86 ± 0,03
PMA	0,379 ± 0,014	0,199 ± 0,010
FGZ	0,51 ± 0,12	0,89 ± 0,05

Monomérico libre (ML); monomérico encapsulado en microesferas de albúmina (MMA); gel monomérico en complejos de γ-ciclodextrinas (MGC); dimérico libre (DL); dimérico encapsulado en microesferas de albúmina (DMA); poliagregado libre (PL); poliagregado encapsulado en microesferas de albúmina (PMA); Fungizona® (Fgz); deoxicolato de anfotericina B (AnB-D).

Alteraciones morfológicas inducidas por la anfotericina B

La preparación de las muestras para la microscopia electrónica de barrido (MEB), fue realizada a partir de cultivos de promastigotes de *L. infantum*, previamente expuestos durante 48 horas a la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de la AnB monomérica, dimérica y poliagregada (0,26; 0,23 y 2,33 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), además de un grupo control no tratado. Todas las muestras fueron fijadas, deshidratadas, metalizadas y visualizadas al microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM-950. Las fotografías que se recogen en la Fig. 54, se realizaron con una cámara digital Zeiss incorporada al microscopio.

Las fotografías A1, A2 y A3 corresponden al control de crecimiento de los promastigotes no tratados. La morfología superficial exhibe su forma elongada característica, provista de un gran flagelo polar y están agrupadas en racimo, formando rosetas, típicas de la fase de crecimiento logarítmico. En cambio, la morfología de los promastigotes tratados con las tres formulaciones de AnB, presentaban alteraciones morfológicas superficiales, entre las que se destacaba la formación de poros en la superficie celular (flechas negras). Los promastigotes expuestos a la AnB dimérica, presentan en su membrana poros más numerosos y de mayor tamaño (Fig. 54: C1, C2 y C3). Por el contrario, los promastigotes expuestos a la AnB monomérica presentaron poros muy pequeños en su superficie (Fig. 54: B1, B2 y B3). Finalmente, los promastigotes expuestos a la AnB poliagregada presentan poros en número y tamaño medianos en comparación con las anteriores formulaciones, (Fig. 54: D1, D2 y D3).

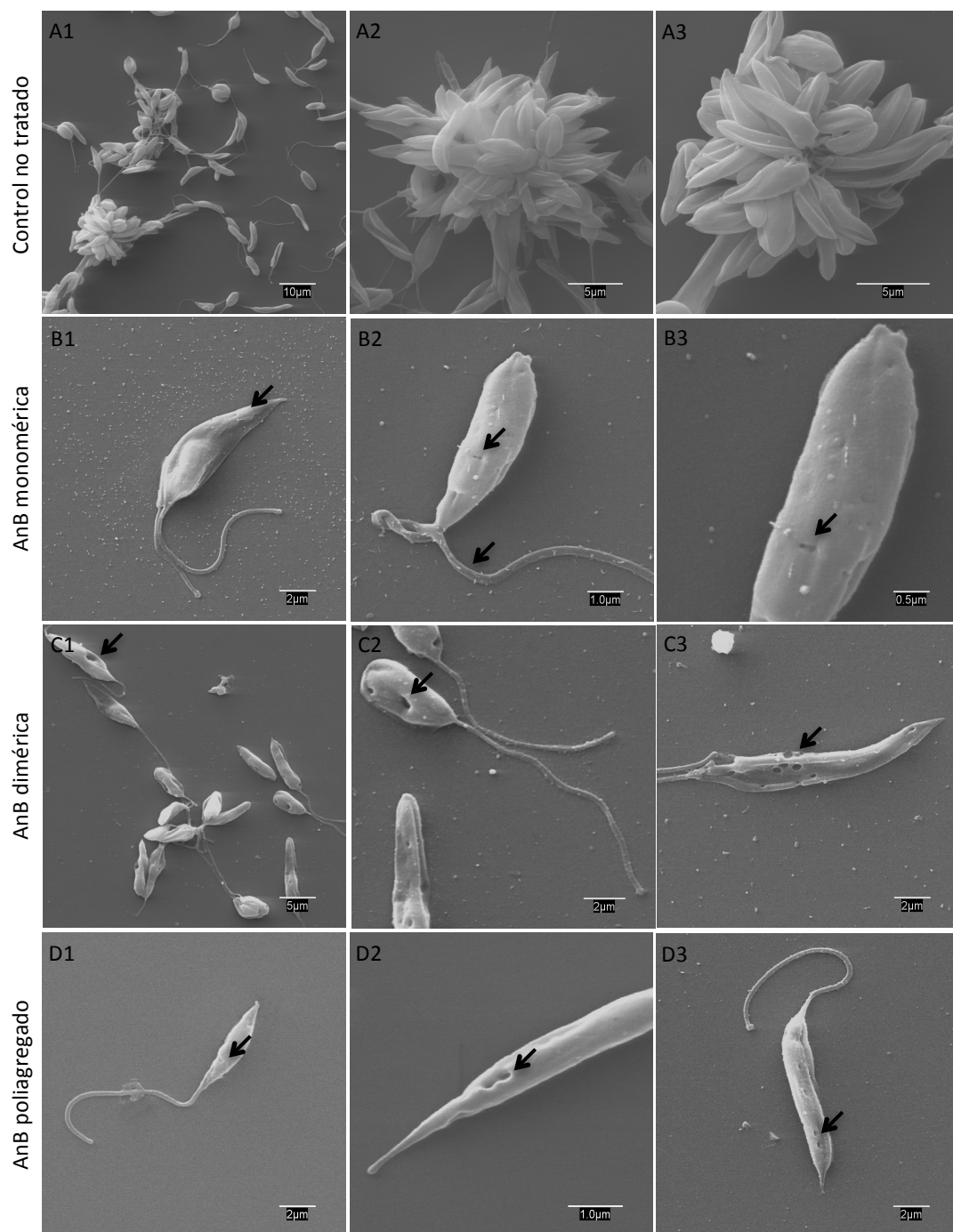


Fig. 54. Alteraciones morfológicas de *L. infantum* inducidas por la AnB en sus distintos estados de agregación. A1, A2 y A3: Promastigotes no tratados ; B1, B2 y B3: tratados con AnB monomérica; C1, C2 y C3: tratados con AnB dimérica; D1, D2 y D3: tratados con AnB poliagregado.

CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO* DE PRODUCTOS OBTENIDOS DE PLANTAS MEDICINALES.

Actividad leishmanicida de extractos de *Piper* spp. frente a promastigotes de *Leishmania*.

Siguiendo la metodología descrita en el capítulo II, hemos evaluado la actividad leishmanicida de los extractos etanólico, diclorometano, éter o acetato de etilo de las hojas de cada una de las especies de *Piper*, preparados por el equipo de investigación dirigido por la Dra. Esther Flores del I.I.F.B. de la UMSA. Además, se evaluó la citotoxicidad frente a macrófagos J774. En la Tabla 38 se recogen los resultados de la actividad leishmanicida y la toxicidad celular.

Tabla 38. Actividad leishmanicida y citotóxica del extracto etanólico y de las fracciones diclorometano y éter de *Piper* sp.

Plantas	Extractos	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
		<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
<i>Piper</i>	Etanólico	64,33 ± 0,86	58,25 ± 3,19	51 ± 0,70	48,52 ± 0,45	Nc
<i>divaricatum</i>	Diclorometano	34,65 ± 0,29	30,24 ± 1,44	26,3 ± 1,01	26,82 ± 0,23	36,6 ± 3,12
	Éter	80,88 ± 8,42	59,08 ± 4,64	71,17 ± 1,64	52,81 ± 2,50	Nc
<i>Piper</i>	Etanólico	Na	Na	Na	Na	Nc
<i>braziliensis</i>	Diclorometano	Na	Na	Na	Na	22,5 ± 1,34
	Éter	39,42 ± 1,62	80,95 ± 5,50	Na	51,7 ± 3,50	42,1 ± 3,88
<i>Piper</i>	Etanólico	>100	>100	Na	Na	Nc
<i>reticulatum</i>	Diclorometano	24,22 ± 1,21	50,24 ± 1,21	82,59 ± 1,20	32,42 ± 0,52	27,8 ± 2,51
	Éter	18,49 ± 0,82	36,85 ± 0,40	47,39 ± 1,33	16,57 ± 0,54	24,5 ± 1,75
<i>Piper</i>	Etanólico	39 ± 0,53	19,38 ± 1,61	>100	43,15 ± 4,50	Nc
<i>bartlingianum</i>	Diclorometano	3,56 ± 0,07	1,27 ± 0,07	11,52 ± 0,24	4,59 ± 0,48	19,4 ± 0,89
	Éter	7,06 ± 0,12	3,22 ± 0,36	21,17 ± 1,35	6,44 ± 0,68	Nc
<i>Piper</i>	Etanólico	29,96 ± 3,07	48,07 ± 0,94	60,59 ± 1,16	29,24 ± 5,19	Nc
<i>pseudoarboreum</i>	Diclorometano	3,53 ± 0,09	5,87 ± 0,08	7,72 ± 0,18	3,87 ± 0,46	Nc
	Éter	9,31 ± 0,82	19,64 ± 0,12	29,11 ± 0,03	11,01 ± 0,48	44,2 ± 3,21
<i>Piper</i>	Etanólico	Na	Na	Na	Na	Nc
<i>strigosum</i>	Diclorometano	23,15 ± 1,72	25,83 ± 0,55	44,24 ± 0,55	17,3 ± 0,26	92 ± 6,30
	Éter	24,79 ± 2,78	19,73 ± 1,12	36,32 ± 1,03	14,31 ± 1,22	95,6 ± 7,21

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na) y No citotóxico (Nc) a concentraciones menores de 100 µg/mL.

Todas las plantas demostraron ser potenciales fuentes de metabolitos con actividad leishmanicida, al menos en uno de sus extractos. Debemos resaltar que los extractos de *Piper pseudoarboreum* y *Piper divaricatum* son activos frente a todas las especies de *Leishmania*. Por otro lado, los extractos etanólico y diclorometano de *Piper braziliensis* no presentaron actividad leishmanicida y la mostrada por el extracto éter fue debido fundamentalmente a su acción tóxica.

Los extractos más interesantes, por mostrar actividad leishmanicida frente a las cuatro especies de *Leishmania*, sin presentar efectos citotóxicos a concentraciones menores de 100 µg/mL, fueron el extracto etanólico y éter de *Piper divaricatum*, el extracto éter de *Piper bartlingianum* y los extractos etanólico y diclorometano de *Piper pseudoarboreum*.

Actividad leishmanicida de extractos, fracciones, subfracciones y metabolitos secundarios de Piper delineatum, Piper pseudoarboreum y Piper divaricatum frente a promastigotes de Leishmania.

Se ha evaluado la actividad leishmanicida y citotóxica del extracto etanólico (pdE), la fracción acuosa (pdA) y fracciones y subfracciones diclorometano (pdD), acetato de etilo (pdAE) y metabolitos secundarios, obtenidos de las hojas de estas plantas e identificadas por el equipo de investigación dirigido por la Dra. Isabel López Bazzocchi de la Universidad de La Laguna.

1. Piper delineatum.

Los resultados de la actividad leishmanicida y citotóxica se detalla en la Tabla 39. Tanto el extracto etanólico, como las fracciones diclorometano y acetato de etilo, presentaron una marcada actividad frente a las cuatro especies de *Leishmania*, por lo que se continuó con el cribado farmacológico de las subfracciones diclorometano (D1 – D13) y acetato de etilo (D25 – D30), de los que se puede destacar la actividad leishmanicida de la subfracción diclorometano D4, ya que no presenta citotoxicidad a concentraciones inferiores a 100 µg/mL, y su actividad leishmanicida frentes a las 4 especies en un rango de

IC₅₀ (20,6 – 39,2 µg/mL), siendo *L. braziliensis* la más susceptible. De modo particular se puede apreciar que la subfracción D3 presenta actividad leishmanicida únicamente sobre *L. braziliensis* (IC₅₀ 26,7 µg/mL), sin efectos citotóxicos a concentraciones menores a 100 µg/mL.

Tabla 39. Actividad leishmanicida y citotoxicidad del extracto etanólico (pdE), las fracciones diclorometano (pdD), acetato de etilo (pdAE) y acuoso (pdA), subfracciones diclorometano (D1 – D13) y acetato de etilo (D25 – D30) de *Piper delineatum*.

Código	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
pdE	9,1 ± 0,45	8 ± 0,93	7,6 ± 1,28	5,5 ± 0,61	7,1 ± 0,61
pdD	6,9 ± 0,84	3 ± 0,15	9,4 ± 0,64	4,7 ± 0,16	6,6 ± 0,13
pdAE	6,7 ± 0,72	3,4 ± 1,04	8,3 ± 0,07	4,9 ± 0,18	4,9 ± 0,35
pdA	Na	Na	Na	Na	Nc
D1	23,3 ± 1,12	27 ± 1,31	35,1 ± 0,49	32,7 ± 1,37	31,2 ± 1,37
D2	Na	Na	Na	Na	Nc
D3	26,7 ± 3,13	Na	Na	Na	Nc
D4	20,6 ± 1,03	33,4 ± 1,87	39,2 ± 1,75	27,9 ± 0,46	Nc
D5	Na	Na	Na	Na	Nc
D6	1,9 ± 0,04	2,7 ± 0,11	4,1 ± 0,03	3,1 ± 0,04	15,5 ± 0,97
D7	0,8 ± 0,03	1,2 ± 0,03	1,5 ± 0,07	1,4 ± 0,05	9,2 ± 1,23
D8	1 ± 0,10	1,4 ± 0,03	1,7 ± 0,07	1,7 ± 0,06	10,9 ± 0,57
D9	4,2 ± 0,21	4,4 ± 0,09	4,4 ± 0,12	5,4 ± 0,08	17,5 ± 1,23
D10	2,6 ± 0,02	2,4 ± 0,07	2,1 ± 0,04	3 ± 0,06	4,5 ± 0,88
D11	4 ± 0,11	4,4 ± 0,02	3,3 ± 0,20	5 ± 0,04	10,6 ± 1,38
D12	19,4 ± 0,12	20,5 ± 0,53	17 ± 0,85	22,4 ± 0,36	97,9 ± 4,26
D13	Na	Na	Na	Na	Nc
D25	Na	Na	Na	Na	Nc
D26	2,2 ± 0,02	2,2 ± 0,07	1,8 ± 0,03	2,8 ± 0,03	3,2 ± 0,05
D27	2,6 ± 0,03	2,4 ± 0,05	2 ± 0,06	3,1 ± 0,08	2,7 ± 0,10
D28	Na	Na	Na	Na	Nc
D29	Na	Na	Na	Na	Nc
D30	Na	Na	Na	Na	Nc
M	7,2 ± 0,22	7,9 ± 0,51	12,5 ± 0,41	7,2 ± 0,60	55,4 ± 4,19

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na) y No citotóxico (Nc) a concentraciones menores de 100 µg/mL; miltefosina (M).

A pesar de la excelente actividad leishmanicida de las otras subfracciones evaluadas, también presentaron citotoxicidad en macrófagos J774. Sin embargo, se continuó con la evaluación de los metabolitos aislados de esta planta, en la que se identificaron principalmente chalconas, flavanonas y una dihidrochalcona, aisladas e identificadas por el equipo de investigación de la Dra. Isabel López

Bazzocchi (Tabla 40). Todas las chalconas evaluadas presentaron excelente actividad leishmanicida frente a las 4 especies de *Leishmania* evaluadas, entre las que cabe destacar las chalconas pdP1, pdP2, pdP5, pdP6, pdP23, pdP24, pdP38 y pdP47, aunque todas mostraron citotoxicidad. Sin embargo, la dihidrochalcona pdP37 demostró una moderada actividad leishmanicida (IC₅₀ 13 – 18,1 µg/mL) en comparación a la miltefosina, sin presentar citotoxicidad a concentraciones menores a 100 µg/mL. Asimismo, se observó que solamente algunas flavononas eran activas frente a las cuatro especies de *Leishmania*, de las que se pueden destacar las flavononas pdP20, pdP28 y pdP29, por presentar una moderada actividad leishmanicida, sin evidenciarse citotoxicidad en células J774.

Tabla 40. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de los metabolitos de *Piper delineatum*.

Código	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
pdP1	3 ±0,15	1,6 ±0,17	2,9 ±0,37	2,1 ±0,14	3,7 ±0,21
pdP2	3 ±0,15	1,6 ±0,05	1,9 ±0,06	1,6 ±0,05	3,8 ±0,08
pdP3	18,1 ±0,45	15 ±0,53	7,7 ±0,24	8,5 ±0,17	16,8 ±0,84
pdP5	0,2 ±0,02	0,3 ±0,01	0,7 ±0,04	0,8 ±0,05	4,7 ±0,20
pdP6	8,1 ±0,21	6,1 ±0,15	5,9 ±0,11	5,7 ±0,06	5,2 ±0,03
pdP10	15 ±0,27	13 ±0,58	12,3 ±0,33	15,9 ±0,63	45,4 ±2,34
pdP13	31,3 ±10,4	Na	Na	31,9 ±3,46	Nc
pdP16	17,8 ±0,92	19 ±0,58	16,2 ±0,59	18,7 ±0,94	34,3 ±2,81
pdP17	36 ±0,37	35 ±0,44	34,6 ±1,33	38,6 ±1,86	21,7 ±1,20
pdP18	Na	Na	Na	Na	Nc
pdP20	25,3 ±0,51	20 ±0,38	19,4 ±0,44	23,3 ±0,98	Nc
pdP21	19,8 ±0,07	19 ±1,51	21,4 ±0,62	21 ±0,13	14,6 ±0,65
pdP23	0,5 ±0,04	1,2 ±0,04	1,3 ±0,01	1,1 ±0,12	4,7 ±0,24
pdP24	1,9 ±0,09	2,6 ±0,03	3 ±0,05	2,9 ±0,32	7,6 ±0,35
pdP28	65,9 ±2,88	Na	57,1 ±2,51	53,69 ±4,70	Nc
pdP29	63,6 ±1,14	92,7 ±3,21	54,9 ±1,10	71,57 ±3,10	Nc
pdP31	Na	Na	Na	Na	Nc
pdP33	12,9 ±0,22	12 ±0,28	12,2 ±0,24	16,5 ±0,11	58,3 ±2,60
pdP37	16,6 ±0,46	13 ±0,70	18,1 ±0,24	16,8 ±1,22	Nc
pdP38	1,7 ±0,05	1,7 ±0,03	1,8 ±0,04	2 ±0,05	7,1 ±0,53
pdP47	2,6 ±0,00	2,9 ±0,01	3 ±0,02	3,5 ±0,05	10,2 ±1,10
M	7,2 ±0,22	7,9 ±0,51	12,5 ±0,41	7,2 ±0,60	55,4 ±4,19

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na) y No citotóxico (Nc) a concentraciones menores de 100 µg/mL; miltefosina (M).

2. *Piper pseudoarboreum*.

En el detalle de los resultados expresados en la Tabla 41, se puede observar que el extracto etanólico presentaba una moderada actividad frente a las 4 especies de *Leishmania*. Esta actividad se ve incrementada en la fracción diclorometano, en cambio las fracciones acetato de etilo y acuosa resultaron inactivas. Además, se evaluó la actividad leishmanicida de las subfracciones diclorometano pp1 – pp7, de las que se puede destacar la elevada actividad de la subfracción pp6, siendo algo menos activas las fracciones pp5 y pp7, aunque también presentaron citotoxicidad en células J774. La subfracción pp3 presentó una moderada actividad leishmanicida, específicamente sobre *L. guyanensis* (IC₅₀ 64,0 µg/mL) y *L. amazonensis* (IC₅₀ 64,0 µg/mL), y no fue citotóxica a concentraciones menores de 100 µg/mL.

Tabla 41. Actividad leishmanicida y citotoxicidad del extracto etanólico (ppEt), las fracciones diclorometano (ppDC), acetato de etilo (ppAE) y acuosa (ppAQ), subfracciones diclorometano (pp1 – pp7) de *P. pseudoarboreum*.

Código	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
ppEt	21,3 ±0,95	41,3 ±1,4	31,4 ±2,54	32,3 ±1,38	55 ±4,13
ppDC	14,7 ±0,78	19,1 ±0,23	17,7 ±0,25	18,3 ±0,28	34,1 ±3,41
ppAE	Na	Na	Na	Na	Nc
ppAQ	Na	Na	Na	Na	Nc
pp1	Na	Na	Na	Na	Nc
pp2	Na	Na	Na	Na	Nc
pp3	Na	64 ±4,79	70,9 ±1,46	Na	Nc
pp4	Na	Na	Na	Na	Nc
pp5	15,7 ±2,78	20,8 ±0,77	18,5 ±0,13	20,3 ±0,34	22,6 ±2,15
pp6	2,2 ±0,07	3,4 ±0,19	2,5 ±0,02	3 ±0,06	6,5 ±1,33
pp7	46,7 ±5,14	58,3 ±2,53	40 ±1,11	58 ±1,54	30,8 ±2,78
M	7,2 ±0,22	7,9 ±0,51	12,5 ±0,41	7,2 ±0,6	55,4 ±4,19

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na) y No citotóxico (Nc) a concentraciones menores de 100 µg/mL.

También se evaluó la actividad de las amidas aisladas e identificadas por el equipo de investigación de la Dra. Isabel López Bazzocchi, los resultados se recogen en la Tabla 42. Destacaron las amidas ppP12, ppP13, ppP14 y ppP15 por su potente actividad leishmanicida con una IC₅₀ en el rango 0,5 – 1,7 µg/mL,

frente a todas las especies, siendo la de las amidas ppP19 y ppP18 7,1 – 8,3 y 15,9 – 21,7 µg/mL, respectivamente; todas ellas muy activas en comparación con la miltefosina. Las amidas menos activas fueron ppP16 y ppP31. Sin embargo, este grupo también presentó citotoxicidad aunque su índice de selectividad fue mayor a 2. Finalmente la amida ppP13 presentó una moderada actividad selectiva frente a *L. braziliensis* y *L. infantum*, sin mostrar toxicidad celular a concentraciones inferiores a 100 µg/mL.

Tabla 42. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de los metabolitos de *Piper pseudoarborescens*.

Código	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
ppP2	Na	Na	Na	Na	Nc
ppP10	Na	Na	Na	Na	Nc
ppP11(E)	Na	Na	Na	Na	Nc
ppP11(Z)	Na	Na	Na	Na	Nc
ppP12	0,5 ±0,03	0,6 ±0,04	0,5 ±0,05	1,1 ±0,09	3,3 ±0,21
ppP13	0,5 ±0,06	0,7 ±0,07	0,7 ±0,01	0,7 ±0,05	3,3 ±0,3
ppP14	0,8 ±0,02	1,2 ±0,01	1,1 ±0,04	1,7 ±0,13	4 ±1,15
ppP15	1,1 ±0,05	1,2 ±0,08	1,1 ±0,1	1,7 ±0,07	2,5 ±0,03
ppP16	31,2 ±0,64	23,2 ±1,57	29,5 ±0,73	25,4 ±1,68	16,4 ±6,79
ppP18	19,4 ±1,48	15,9 ±0,03	21,7 ±0,21	16,4 ±1,64	18,5 ±11,3
ppP19	8,3 ±0,29	7,1 ±0,02	8,1 ±0,3	8 ±0,47	6,7 ±0,88
ppP21	Na	Na	Na	Na	Nc
ppP27	Na	Na	Na	Na	Nc
ppP31	35,2 ±3,22	29,5 ±0,79	36,4 ±0,81	42,6 ±3,05	17,5 ±7,71
M	7,2 ±0,22	7,9 ±0,51	12,5 ±0,41	7,2 ±0,6	55,4 ±4,19

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na) y No citotóxico (Nc) a concentraciones menores de 100 µg/mL

3. *Piper divaricatum*.

En la Tabla 43 se recogen los resultados obtenidos de la actividad leishmanicida de los extractos y fracciones de esta planta. El extracto etanólico (pvEt) presentó actividad reducida frente a *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum*, excepto frente a *L. amazonensis*. En la evaluación de las fracciones diclorometano (pvDC), acetato de etilo (pvAE) y acuosa (pvAQ), solamente la fracción pvDC fue activa frente a las cuatro especies de *Leishmania*. También se evaluó la actividad de las

subfracciones 18 – 24, procedentes de la fracción diclorometano y, a excepción de la subfracción 20, todas presentaron actividad leishmanicida moderada, de las que se puede destacar la subfracción 19, ya que no presentaba toxicidad a las concentraciones evaluadas.

Tabla 43. Actividad leishmanicida y citotoxicidad del extracto etanólico (pvEt), las fracciones diclorometano (pvDC), acetato de etilo (pvAE) y acuoso (pvAQ), subfracciones diclorometano (18 – 24), de *Piper divaricatum*.

Código	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
pvEt	57,97 ±1,5	79,2 ±2,51	Na	74,4 ±2,4	30 ±1,51
pvDC	48,4 ±0,9	58,3 ±1,5	64,91 ±1,64	58,9 ±1,8	17,5 ±0,73
pvAE	Na	Na	Na	Na	Nc
pvAQ	Na	Na	Na	Na	Nc
18	28,1 ±1,1	27,8 ±0,97	41,22 ±1,83	32,1 ±0,76	54,1 ±3,31
19	27,9 ±0,22	48,1 ±4,1	72,5 ±2,2	55,4 ±0,32	Nc
20	Na	Na	Na	Na	Nc
21	34,6 ±0,94	40,6 ±0,48	37,3 ±0,6	42,01 ±0,44	54,6 ±2,57
22	36 ±0,23	40,81 ±0,64	47,6 ±0,46	41,5 ±0,78	48,5 ±1,47
23	88,59 ±3,1	96,1 ±3,22	Na	95,1 ±1,61	73,5 ±3,63
24	54,8 ±0,89	72,11 ±0,66	74,9 ±1,5	74,3 ±0,68	13,6 ±0,58
M	7,2 ±0,22	7,9 ±0,51	12,5 ±0,41	7,2 ±0,6	55,4 ±4,19

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na) y No citotóxico (Nc) a concentraciones menores de 100 µg/mL.

Por último, en la Tabla 44 se recogen los resultados de la actividad de 29 metabolitos aislados de *Piper divaricatum* por el equipo de investigación de la Dra. Isabel López Bazzocchi. Siete de ellos no presentaron actividad leishmanicida ni citotóxica. Los fenil propanoides pvP4 y pvP26 solamente fueron activos frente a *L. guyanensis* (IC₅₀ 71,14 y 47,99µg/mL respectivamente), la fenil propanoide pvP3 solamente fue activa frente a *L. guyanensis* y *L. infantum* (IC₅₀ 60,47 y 17,75 µg/mL respectivamente), y la flavona pvP13 fue activa solamente frente a las especies cutáneas *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis* (IC₅₀ 15,68; 23,14 y 18,66 µg/mL respectivamente). Los fenil propanoides pvP24 y pvP25 fueron moderadamente activos frente a las 4 especies de *Leishmania*, con IC₅₀ en un rango de 42,1 – 80,3 y 28,8 – 43,0 µg/mL respectivamente. Ninguno de los metabolitos anteriores presentó toxicidad celular. En cambio el resto de

metabolitos activos frente a *Leishmania*, también fueron citotóxicas. Solamente el flavonoide pvP29 presentó una actividad superior a la miltefosina (IC₅₀ 5,23 – 6,48 µg/mL), sin embargo también mostró efectos citotóxicos.

Tabla 44. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de 29 metabolitos (pvP1 – pvP29) de *Piper divaricatum*.

Código	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
pvP1	Na	Na	Na	Na	Nc
pvP2	36,14 ±1,76	20,08 ±0,14	45,02 ±0,41	51,61 ±0,68	69,5 ±3,48
pvP3	Na	60,47 ±2,32	Na	17,75 ±0,14	Nc
pvP4	Na	71,14 ±1,16	Na	Na	Nc
pvP6	82,84 ±2,8	99,09 ±3,18	74,11 ±1,56	64,13 ±3,11	48,13 ±6,11
pvP7	46,9 ±0,37	44,77 ±0,54	39,28 ±1,11	35,6 ±1,01	26,1 ±1,22
pvP8	Na	Na	Na	Na	Nc
pvP10	57,4 ±1,09	80,25 ±1,15	70,95 ±1,14	42,19 ±0,6	31,78 ±3,04
pvP13	15,68 ±0,28	23,14 ±0,09	18,66 ±0,32	Na	Nc
pvP17	30,5 ±1,09	34,19 ±2,37	33,78 ±1,77	34,44 ±0,99	45,3 ±3,23
pvP18	37,27 ±0,53	20,45 ±2,1	41,17 ±1,18	64,73 ±1,45	80,31 ±3,18
pvP19	Na	Na	Na	Na	Nc
pvP20	34,49 ±2,09	26,49 ±0,95	24,73 ±1,33	33,15 ±1,23	52,66 ±2,33
pvP22	11,53 ±0,37	14,41 ±0,51	15,01 ±0,36	13,05 ±1,47	32,3 ±0,95
pvP24	80,29 ±5,67	42,1 ±1,74	78,31 ±1,36	64,49 ±2,26	Nc
pvP25	43 ±4,34	29,4 ±1,04	57,28 ±10,68	28,76 ±1,63	Nc
pvP26	Na	47,99 ±8,67	Na	Na	Nc
pvP27	Na	Na	Na	Na	Nc
pvP29	5,83 ±0,11	6,48 ±0,09	5,23 ±0,44	5,5 ±0,25	27,45 ±2,85
M	7,2 ±0,22	7,9 ±0,51	12,5 ±0,41	7,2 ±0,6	55,4 ±4,19

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na) y No citotóxico (Nc) a concentraciones menores de 100 µg/mL.

Actividad leishmanicida de metabolitos secundarios de *Piper delineatum* y *P. pseudoarborescens* frente a amastigotes intracelulares.

En la Tabla 45 se recogen los resultados de la actividad leishmanicida de 5 metabolitos frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum*.

En todos ellos se puede observar que su actividad disminuye considerablemente en comparación con los resultados frente a promastigotes, también se puede notar que las formas amastigotes intracelulares de *L. infantum* son mucho más susceptible que las de *L. amazonensis* (ver Tablas 42 y 44).

Tabla 45. Actividad leishmanicida de metabolitos de *Piper delinatum* (pdP) y *Piper pseudoarboresum* (ppP) frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum*.

Código	IC ₅₀ (µg/mL)	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
pdP23	2,59 ±0,06	1,79 ±0,09
pdP24	>5 ±0,06	4,36 ±0,71
pdP5	4,83 ±0,09	1,94 ±0,27
ppP12	2,57 ±0,19	Nd
ppP13	2,6 ±0,06	Nd
M	20,09 ±1,47	23,7 ±1,78

No determinado (Nd).

CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO* DE COMPUESTOS DE SÍNTESIS QUÍMICA

Actividad leishmanicida de compuestos derivados de sulfonamidas frente promastigotes de Leishmania.

Continuando con el modelo de cribado farmacológico *in vitro* frente a promastigotes de cuatro especies de *Leishmania* y el modelo de citotoxicidad en macrófagos J774, hemos evaluado la actividad leishmanicida de 2 series de derivados sulfonamidas (Ver anexo 1).

Los resultados de la actividad leishmanicida de la primera serie se recogen en la Tabla 46. De los 30 compuestos evaluados, 18 no presentaron actividad leishmanicida. En cambio podemos destacar la actividad leishmanicida de las sulfonamidas 1a, 2d, 5, 6a y 6b frente a las cuatro especies de *Leishmania* evaluadas. Además los compuestos 1a y 2d no presentan efectos citotóxicos incluso a la concentración de 250 µM. También, se puede destacar que *L. braziliensis* es la especie más susceptible a los derivados sulfonamidas.

Los resultados de la actividad leishmanicida de la segunda serie, se recogen en la Tabla 47. Este grupo está constituido por 64 derivados sulfonamidas, en los que

se puede observar claramente la variación de la susceptibilidad de las cuatro especies de *Leishmania*, tanto al fármaco control de referencia (miltefosina), como a las diferentes sulfonamidas evaluadas. Se han excluido de esta Tabla las sulfonamidas 1b, 2b, 2c, 4a, 4b, 4c, 10e, 12d, 12e, 13c, 15b y 15c por no presentar actividad leishmanicida frente a ninguna de las 4 especies evaluadas.

Tabla 46. Actividad leishmanicida y toxicidad celular de N-bencensulfonamidas: primera serie (1-6).

Código	IC ₅₀ (μM)				CC ₅₀ (μM)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
1a	48,8 ± 2,3	46,4 ± 2,1	68,6 ± 3,4	76,4 ± 3,6	Nc
1i	247,5 ± 8,5	Nd	Nd	223,1 ± 5,8	Nc
1j	223,3 ± 5,2	110,0 ± 2,7	214,6 ± 4,4	216,0 ± 6,2	Nc
1n	61,5 ± 1,2	84,2 ± 2,0	Nd	66,2 ± 1,8	Nc
2a	93,5 ± 3,1	169,0 ± 5,8	Nd	Nd	Nc
2b	139,4 ± 4,2	169,2 ± 6,1	Nd	175,1 ± 5,9	Nc
2d	1,5 ± 0,2	33,2 ± 1,9	5,0 ± 0,2	29,1 ± 1,4	Nc
2e	147,5 ± 5,1	108,4 ± 4,2	Nd	112,9 ± 3,3	Nc
4	Nd	83,4 ± 2,7	163,6 ± 4,8	Nd	Nc
5	80,8 ± 3,2	139,6 ± 3,6	66,7 ± 2,9	61,3 ± 2,8	132,9 ± 3,2
6a	55,9 ± 2,4	39,0 ± 1,6	11,4 ± 0,6	3,1 ± 0,2	61,0 ± 3,4
6b	22,0 ± 1,0	1,9 ± 0,1	18,0 ± 1,1	6,8 ± 0,5	94,0 ± 2,7
M	17,7 ± 0,5	19,4 ± 1,3	30,7 ± 1,0	17,7 ± 1,5	135,9 ± 9,3

No activo (Na); No citotóxico (Nc); No determinado (Nd); Miltefosina (M).

En el análisis comparativo de la susceptibilidad, entre las especies de *Leishmania* utilizadas, hemos observado que las especies del subgénero *Leishmania* (*Viannia*) son más susceptibles a las sulfonamidas que las especies del subgénero *Leishmania* (*Leishmania*). Sin embargo, *L. infantum* es más susceptible que *L. braziliensis* frente a algunas sulfonamidas como se aprecia en la Tabla mencionada.

Hemos identificado 19 sulfonamidas con actividad leishmanicida sin presentar efectos citotóxicos, de los que se pueden destacar la 6d y 14d (IC₅₀ <25 μM) frente a las cuatro especies de *Leishmania*, que mostraban una actividad inhibitoria superior a la miltefosina. Asimismo, las sulfonamidas 8c y 9c (IC₅₀ < 50 μM) presentaron una actividad comparable a la miltefosina. Por otra parte las

sulfonamidas 1a, 5b, 6b, 10a, 10b, 12a y 12c fueron menos activas ($IC_{50} < 100 \mu M$) en comparación a la miltefosina y las sulfonamidas 3d, 6a, 7a, 9d, 10c, 10d, 14c ($IC_{50} < 200 \mu M$), con débil actividad en comparación con la miltefosina. Finalmente, es interesante mencionar que la sulfonamida 2a, no siendo muy activa frente a las especies cutáneas de *Leishmania*, si lo es frente a *L. infantum* ($IC_{50} 66,2 \mu M$).

Tabla 47. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de compuestos derivados de N-bencenosulfonamidas y N-naftalensulfonamidas: segunda serie (1-15).

Código	$IC_{50} (\mu M)$				$CC_{50} (\mu M)$
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
1a	48,88 \pm 1,87	46,39 \pm 1,84	68,57 \pm 1,36	76,36 \pm 2,30	>356,81
1c	Na	103,4 \pm 5,01	63,09 \pm 1,15	Na	>350,48
2a	117,8 \pm 3,65	300,4 \pm 9,68	356,8	66,2 \pm 1,32	>356,81
2d	158,8 \pm 5,64	250,3 \pm 8,65	Na	283,9 \pm 9,34	>350,48
3a	93,55 \pm 2,85	386,6 \pm 9,12	Na	249,7 \pm 6,70	Nc
3b	Na	251,2	Na	Na	Nc
3c	Na	Na	230,6 \pm 9,63	Na	Nc
3d	164,8 \pm 2,84	115 \pm 4,11	159,8 \pm 3,95	121,2 \pm 3,27	>346,28
3e	250,5 \pm 6,39	169,9 \pm 6,42	Na	268,9 \pm 8,25	>393,19
5a	42,51 \pm 0,98	24,6 \pm 0,65	27,02 \pm 1,35	39,47 \pm 1,13	41,3 \pm 2,96
5b	37,02 \pm 0,64	4,39 \pm 0,06	82,82 \pm 1,21	51,45 \pm 0,85	>313,7
5c	162,1 \pm 2,46	93,55 \pm 2,81	93,55 \pm 3,62	Na	>351,7
5d	Na	135,2 \pm 4,33	186,9 \pm 7,46	Na	>299,05
6a	86,54 \pm 6,55	164,3 \pm 7,38	164,3 \pm 4,33	178,9 \pm 6,55	>303,65
6b	29,8 \pm 0,55	22,59 \pm 0,64	8,47 \pm 0,09	21,02 \pm 0,38	60,86 \pm 3,00
6c	68,23 \pm 1,85	Na	Na	Na	Nc
6d	23,09 \pm 0,26	15,85 \pm 0,27	24,52 \pm 0,12	20,34 \pm 0,65	>299,05
6e	Na	80,38 \pm 1,55	216,8 \pm 4,60	Na	Nc
7a	60,85 \pm 2,05	101,4 \pm 2,55	197,7 \pm 4,33	81,74 \pm 3,65	>302,74
7b	80,96 \pm 3,22	25,94 \pm 1,21	46,26 \pm 1,12	51,52 \pm 1,69	24,01 \pm 0,98
7c	174,8 \pm 6,42	Na	Na	137,3 \pm 3,27	>312,72
7d	13,42 \pm 0,41	29,82 \pm 0,95	14,25 \pm 0,68	33,39 \pm 1,10	43,95 \pm 2,05
7e	Na	109,5 \pm 3,51	Na	272,8 \pm 6,36	Nc
8a	16,9 \pm 0,54	19,62 \pm 0,22	15,78 \pm 0,22	35,01 \pm 1,12	22,2 \pm 1,46
8b	23,07 \pm 0,42	10,29 \pm 0,11	18,02 \pm 0,11	12,47 \pm 0,27	194,8 \pm 6,33
8c	28,99 \pm 1,00	20,95 \pm 0,56	15,37 \pm 0,25	23,4 \pm 0,95	>349,22
8d	42,72 \pm 1,33	116,7 \pm 1,46	12,49 \pm 0,12	34,5 \pm 0,62	40,42 \pm 1,44
8e	11,59 \pm 0,17	13,67 \pm 0,28	7,43 \pm 0,02	11,89 \pm 0,21	24,67 \pm 1,30
9a	81,03 \pm 2,11	139,8 \pm 6,22	66,92 \pm 1,12	61,48 \pm 0,99	155,6 \pm 2,64
9b	Na	208,4 \pm 9,23	182,1 \pm 5,62	132,2 \pm 4,56	>445,57
9c	40,25 \pm 0,96	47,93 \pm 1,16	38,71 \pm 0,43	37,32 \pm 0,85	>365,88
9d	86,63 \pm 1,86	101,9 \pm 3,49	115,7 \pm 3,55	65,39 \pm 2,11	>343,58
9e	39,76 \pm 0,75	52,82 \pm 0,94	37,75 \pm 0,95	37,3 \pm 1,23	29,98 \pm 0,99
10a	21,68 \pm 0,91	48,07 \pm 1,16	60,32 \pm 1,55	43,35 \pm 1,20	>314,16

10b	35,62 ± 0,85	46,09 ± 0,94	59,08 ± 1,11	43,55 ± 1,23	>324,93
10c	94,91 ± 2,65	128,9 ± 4,65	110,6 ± 3,22	159,8 ± 5,23	Nc
10d	88,89 ± 3,45	96,34 ± 1,29	108 ± 1,67	94,87 ± 1,98	>343,29
11a	Na	Na	Na	161,4 ± 3,70	>298,19
11b	Na	Na	Na	120,1 ± 2,16	>307,87
11c	Na	68,16 ± 2,98	Na	Na	Nc
12a	31,01 ± 1,02	53,67 ± 1,64	89,58 ± 2,15	85,52 ± 2,43	>298,19
12b	195,5 ± 3,15	Na	Na	Na	Nc
12c	30,65 ± 1,16	23,76 ± 0,37	82,66 ± 0,95	18,43 ± 0,24	>344,4
13a	113,7 ± 3,95	Na	Na	Na	>350,48
13b	Na	Na	Na	351,7 ± 3,65	Nc
13d	227,2 ± 8,55	Na	Na	Na	Nc
14a	212,4 ± 6,87	Na	90,3 ± 1,55	229 ± 7,65	>264,27
14b	Na	58,08 ± 1,21	Na	204,4 ± 1,65	Na
14c	115,3 ± 3,96	54,32 ± 2,13	40,95 ± 1,22	112,4 ± 4,22	>417,83
14d	9,94 ± 0,12	7,25 ± 0,09	24,59 ± 0,95	6,69 ± 0,12	>329,58
15a	36,75 ± 0,91	77,59 ± 1,65	183,8 ± 3,22	Na	>314,12
15d	21,03 ± 0,55	44,83 ± 0,85	Na	Na	>309,21
M	17,7 ± 0,5	19,4 ± 1,3	30,7 ± 1,0	17,7 ± 1,5	135,9 ± 9,3

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); miltefosina (M).

Actividad leishmanicida de compuestos derivados de sulfonamidas frente a amastigotes intracelulares.

Continuando con la selección de compuestos, hemos evaluado la actividad leishmanicida, sobre las formas amastigotes intracelulares de *L. infantum* y *L. amazonensis*, de aquellas sulfonamidas que resultaron más activas frente a las formas promastigotes.

En la Tabla 48, se describen los resultados de la actividad leishmanicida sobre amastigotes intracelulares de sulfonamidas seleccionadas de las series 1 y 2 con potencial actividad a las formas promastigotes (Tabla 46 y 47).

De la primera serie, se han seleccionado las sulfonamidas 1a, 1n y 2d por ser activas frente a *L. infantum* y por no presentar efectos citotóxicos sobre macrófagos J774.

La mayoría de las sulfonamidas de la serie 2, también reducen su actividad leishmanicida en comparación con la actividad frente a las formas promastigotes.

Sin embargo, se destaca la actividad leishmanicida de la sulfonamida 9c en amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*, pues es más activo que en las formas promastigotes (IC_{50} 38,7 μ M). Por otra parte, la actividad leishmanicida, en amastigotes intracelulares de *L. infantum* de las sulfonamidas 6d y 14d no se diferencia significativamente de los resultados obtenidos en promastigotes (IC_{50} 20,3 y 6,6 μ M respectivamente). Finalmente, es importante resaltar que la sulfonamida 14d es más activa que la miltefosina, especialmente en *L. infantum*.

Tabla 48. Actividad leishmanicida de sulfonamidas en amastigotes intracelulares de *L. infantum* y *L. amazonensis*. Miltefosina (M).

Compuestos	IC_{50} (μ M)	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
1 ^a	Nd	88,5
1n	Nd	79,2
2d	Nd	90,3
6d	42,9	23
8c	64,1	47,3
9c	30,8	83,2
12c	77,5	39,2
14d	18	7,1
M	20,9	23,7

Alteraciones ultraestructurales inducidas por las sulfonamidas

Microscopía Electrónica de Barrido

La preparación de las muestras para la MEB, fue realizada a partir de cultivos de promastigotes de *L. infantum* previamente expuestos durante 48 horas a la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de las sulfonamidas 1a, 1n y 2d (76,4; 66,2 y 29,1 μ g/mL respectivamente), además de un grupo control de crecimiento no tratado. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio digital de barrido Zeiss DSM-950.

La fotografías obtenidas se recogen en la Fig. 55, en los que las imágenes A1 – A3 corresponden al control de crecimiento de los promastigotes no tratados. La visión superficial muestra la forma elongada provista de un gran flagelo polar

característica básica de los promastigotes, se agrupan en racimos formando rosetas correspondiente a la fase de crecimiento logarítmico.

Por otro lado, los promastigotes tratados con las diferentes sulfonamidas 1a, 1n y 2d, mostraban claramente alteraciones morfológicas. Cabe destacar que las 3 sulfonamidas causaban daños en la superficie del parásito con formación de poros de tamaño variable, próximos al núcleo y con evidente pérdida del contenido intracelular. En los grupos tratados con las sulfonamidas 1a y 2d, también se aprecian daños más extensos en la membrana celular con daño exacerbado del citoesqueleto del parásito.

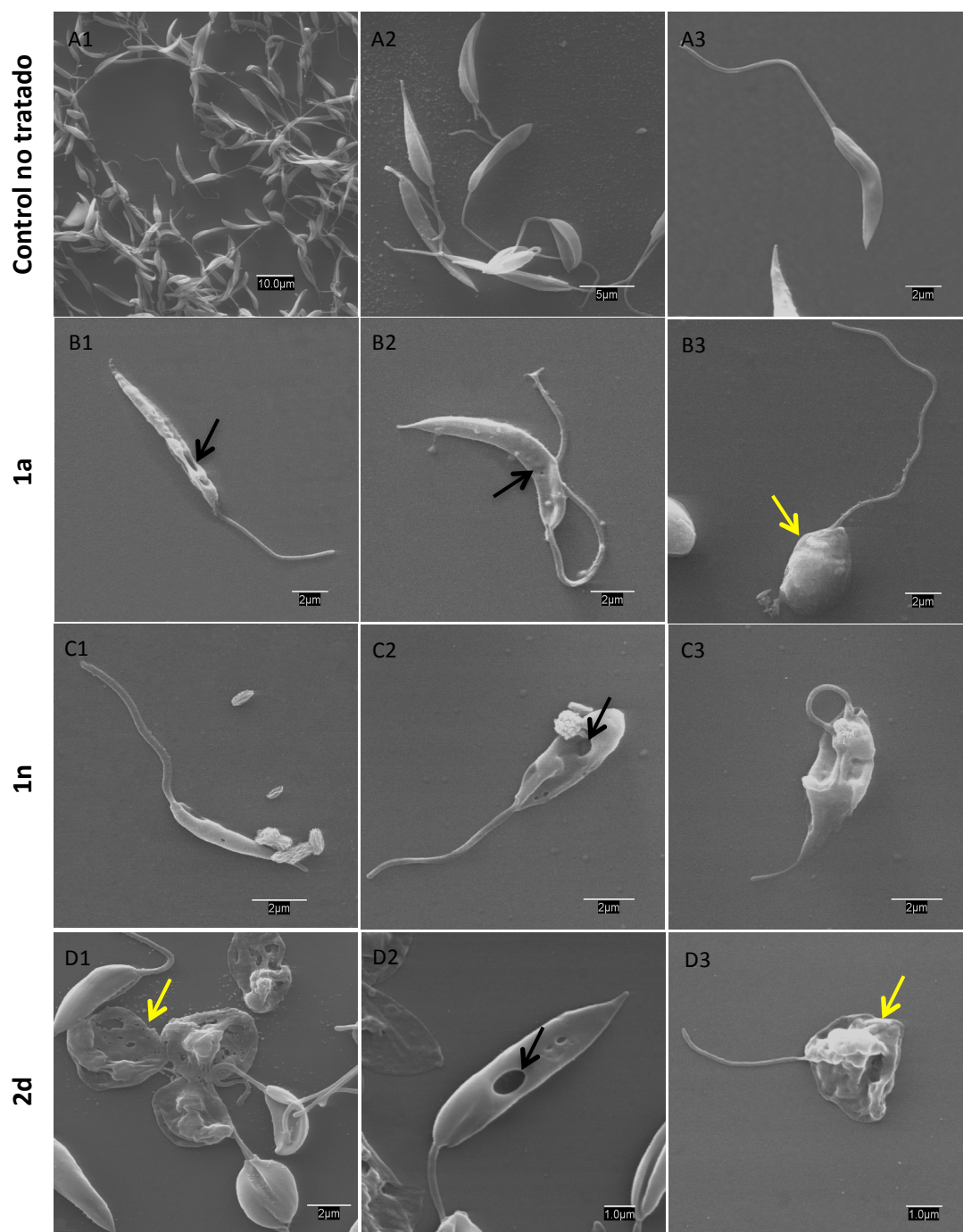


Fig. 55. Alteraciones morfológicas de promastigotes *L. infantum* inducidas por diferentes sulfonamidas. Las fotografías A1 – A3 corresponden a los promastigotes no tratados; las fotografías B1 – B3 a promastigotes tratados con la sulfonamida 1a; las fotografías C1 – C3 a promastigotes tratados con la sulfonamida 1n y finalmente las imágenes D1 – D3 corresponden a los promastigotes tratados con la sulfonamida 2d. Las flechas negras indican daños a nivel del núcleo y las flechas amarillas a daños a nivel de la membrana.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

La preparación de las muestras para la MET, fue realizada a partir de cultivos de promastigotes de *L. infantum* previamente expuestos durante 48 horas a la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de las sulfonamidas 1a, 1n y 2d (76,4; 66,2 y 29,1 µg/mL respectivamente); además se preparó un grupo control de crecimiento no tratado. Las muestras preparadas fueron incluidas en resina plástica *spurr* y los cortes ultrafinos fueron montados en rejillas de cobre previamente recubiertos con una fina capa de formvar. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de transmisión electrónica (Zeiss EM-10). Las imágenes obtenidas fueron fotografiadas con una cámara digital Zeiss incorporada al microscopio.

El análisis ultraestructural por MET de los promastigotes tratados y no tratados de *L. infantum* se puede apreciar en la Fig. 56. Los promastigotes de *L. infantum* no tratados mostraron la ultraestructura clásica de los Kinetoplastidos: un núcleo (N) con su nucléolo (Nu), el kinetoplasto (K) que aparece como una prolongación de las mitocondrias (M), una bolsa flagelar (FP), un flagelo (F) y vacuolas (V). En cambio, los promastigotes de *L. infantum* tratados con las sulfonamidas 1a, 1n y 2d presentaron alteraciones de diferentes orgánulos y componentes citoplasmáticos.

Las fotografías de los promastigotes tratados con las sulfonamidas 1a y 1n mostraron alteraciones significativas a nivel de núcleo, mitocondria y kinetoplasto. Asimismo, los promastigotes tratados con la sulfonamida 2d presentaban una completa desorganización del citoplasma, además de daños en el kinetoplasto, la mitocondria y el núcleo.

En los promastigotes tratados con la sulfonamida 1a, se pueden distinguir claramente las alteraciones en la mitocondria, el kinetoplasto y la bolsa flagelar. Además, se evidenció la ausencia de la membrana nuclear y la pérdida de

algunas inclusiones citoplasmáticas y secciones de la membrana celular. También se observaron múltiples vacuolas y cuerpos electrodensos.

Los promastigotes tratados con la sulfonamida 1n, también presentaron alta desorganización celular, con cambios en sus orgánulos citoplasmáticos, tales como la formación de restos y pérdida de la matriz mitocondrial con alteración del kinetoplasto. Además, se observaron daños de la membrana nuclear y la cromatina. Otros cambios incluyeron la presencia de burbujas lipídicas y el aumento significativo en el número de acidocalcisomas. Curiosamente algunos parásitos mostraron signos de desarrollo anormal, como la formación de tres flagelos a nivel de la bolsa flagelar, sugiriendo un posible efecto del compuesto sobre la citocinesis.

El análisis ultraestructural de los parásitos tratados con la sulfonamida 2d reveló una completa desorganización intracitoplasmática y nuclear, junto con la aparición de cuerpos laminares propios de la alteración de las membranas y posterior vaciamiento celular. También se pueden observar restos de la estructura mitocondrial con ausencia del kinetoplasto. Otros cambios significativos son la abundante presencia de cuerpos electrodensos.

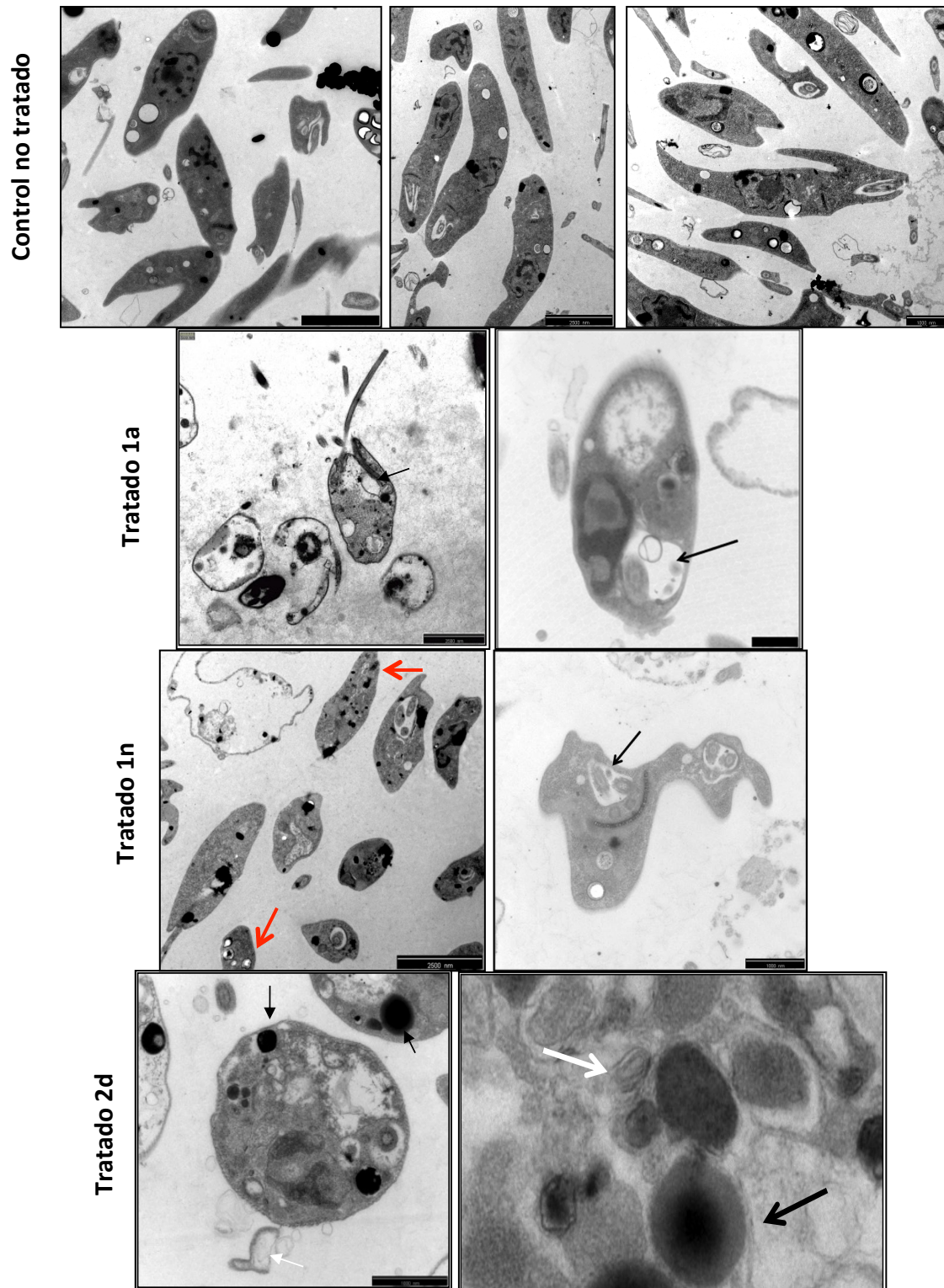


Fig. 56. Alteraciones ultraestructurales de *L. infantum* inducidas por diferentes sulfonamidas. **Tratado con la sulfonamida 1a:** pérdida de la mitocondria y el kinetoplasto, daños en la bolsa flagelar. **Tratado con la sulfonamida 1n:** se destaca el aumento del número de acidocalcisomas (flecha roja) y multiflagelos (flecha negra). **Tratados con la sulfonamida 2d:** se destaca la presencia de abundantes residuos laminares (flecha blanca) y acumulación de cuerpos electrodensos (flecha negra).

Actividad leishmanicida de derivados de oxoisoaporfinas sobre promastigotes de *Leishmania*.

En el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Santiago de Compostela fueron sintetizados 75 compuestos derivados de la oxoisoaporfinas por el Dr. Eduardo Sobarzo Sánchez, cuyas estructuras se recogen en el anexo 1. Hemos evaluado la actividad leishmanicida mediante los modelos *in vitro* previamente descritos sobre promastigotes de 4 especies de *Leishmania*. También se evaluó la citotoxicidad celular. Los resultados de la actividad leishmanicida y citotóxica se describen en las Tablas 49 al 51.

Tabla 49. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de compuestos derivados de oxoisoaporfinas Series OXO (1, 13, 16 y 19), CA (1 – 15) y A (1 – 13).

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
OXO1	48,2 ± 2,67	16,3 ± 1,36	31,8 ± 2,17	42,1 ± 3,49	Nc
OXO13	4,4 ± 0,2	1,8 ± 0,09	3,6 ± 0,34	4,4 ± 0,16	31,1 ± 3,18
OXO19	41,3 ± 3,73	2,1 ± 0,3	Na	Na	Nc
CA1	0,1 ± 0,02	0,9 ± 0,01	2,2 ± 0,07	0,7 ± 0,03	11,2 ± 0,58
CA2	0,1 ± 0,01	1,4 ± 0,10	1,2 ± 0,04	0,8 ± 0,10	16,8 ± 0,49
CA3	8,4 ± 0,46	13,9 ± 0,44	24 ± 2,17	13,1 ± 1,04	Nc
CA5	93,6 ± 17,05	Na	Na	55,1 ± 11,23	Nc
CA8	26,7 ± 1,40	Na	Na	16,3 ± 0,76	27,6 ± 1,19
CA9	47,2 ± 3,58	66,9 ± 2,71	23,7 ± 1,64	30,1 ± 1,60	21,6 ± 1,79
CA11	12 ± 0,12	9,3 ± 0,39	9,7 ± 0,18	11,6 ± 0,35	9,9 ± 0,88
CA12	5,8 ± 0,30	5,2 ± 0,49	5,9 ± 0,46	5,4 ± 0,04	26,7 ± 1,31
CA13	7 ± 0,82	5,8 ± 0,18	6,2 ± 0,30	4,4 ± 0,17	66,4 ± 7,33
CA14	7,8 ± 0,06	8,2 ± 0,59	8,5 ± 0,38	9,2 ± 0,90	25,4 ± 1,60
CA15	13,3 ± 0,59	13,4 ± 0,11	11,5 ± 0,55	9,6 ± 1,77	61,2 ± 2,19
A1	19,3 ± 4,35	Na	Na	Na	91 ± 9,04
A2	68,3 ± 2,84	Na	Na	Na	Nc
A3	2,3 ± 0,12	1,4 ± 0,01	3,1 ± 0,42	0,8 ± 0,10	3,6 ± 0,36
A4	9,6 ± 1,00	3 ± 0,10	7,5 ± 0,33	14,4 ± 1,78	Nc
A5	66,8 ± 6,86	28,5 ± 0,53	59,7 ± 2,86	Na	Nc
A7	56,8 ± 3,25	23,9 ± 1,42	53,5 ± 5,77	23,9 ± 2,52	Nc
A8	3,3 ± 0,39	1,5 ± 0,10	8,1 ± 0,31	3 ± 0,16	Nc
A9	28,4 ± 2,42	13,8 ± 1,06	77,2 ± 7,80	53,5 ± 1,68	Nc
A10	52,7 ± 3,87	49,4 ± 0,82	61,2 ± 7,39	78,3 ± 1,91	Nc
A11	36,9 ± 0,28	21,2 ± 0,69	34,9 ± 1,61	36,4 ± 1,07	Nc
M	7,2 ± 0,22	7,9 ± 0,51	12,5 ± 0,41	7,2 ± 0,6	55,4 ± 4,19

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na); No citotóxico (Nc); No determinado (Nd); Miltefosina (M).

De todos los compuestos evaluados, 58 fueron activos en al menos una especie de *Leishmania*. Los otros compuestos (OXO16, CA4, CA6, CA7, CA10, A6, A12, A13, D3, D7, D8, D10, M1, M4, M6, M9 y M10), han sido excluidos de estas Tablas por no presentar actividad leishmanicida en ninguna de las 4 especies.

Tabla 50. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de compuestos derivados de oxoisoaporfinas Series D (1 – 10), DIME (1 – 3), Me (1 y 3) y M (1 – 14).

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
D1	Na	63,8 ± 2,66	Na	Na	Nc
D2	37,7 ± 0,96	8,5 ± 0,58	31,8 ± 0,88	Na	Nc
D4	10,2 ± 0,05	45,6 ± 1,64	70,7 ± 9,08	13,6 ± 0,54	Nc
D5	5,4 ± 0,01	20,1 ± 1,06	Na	44,3 ± 1,30	Nc
D6	36,8 ± 1,20	Na	Na	Na	Nc
D9	34,2 ± 0,47	17,6 ± 0,22	27,7 ± 0,81	29,6 ± 1,31	Nc
DIME1	4,4 ± 0,22	2,4 ± 0,15	2,7 ± 0,07	3,7 ± 0,49	19,2 ± 1,66
DIME2	31,5 ± 1,18	16,7 ± 0,39	35,8 ± 0,99	69,1 ± 2,73	Nc
DIME3	40,9 ± 2,45	Na	Na	27,4 ± 0,90	Nc
Me1	82,4 ± 4,32	48,4 ± 3,35	Na	Na	Nc
Me3	60 ± 1,22	35 ± 1,99	Na	Na	Nc
M2	45,2 ± 1,73	28,1 ± 0,12	25,3 ± 0,67	33,5 ± 1,52	Nc
M3	Na	66,6 ± 0,95	80,7 ± 5,33	Na	91,7 ± 23,09
M5	13 ± 0,37	10,4 ± 0,09	10,8 ± 0,17	13 ± 0,37	70,7 ± 6,29
M7	0,6 ± 0,05	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,04	0,6 ± 0,05	0,7 ± 0,09
M8	3,4 ± 0,15	2,3 ± 0,07	2,3 ± 0,03	3,4 ± 0,15	36,5 ± 18,73
M11	Na	70,1 ± 1,69	Na	Na	90,9 ± 22,62
M12	25,7 ± 0,58	18,8 ± 0,32	28,2 ± 1,24	25,7 ± 0,58	81,6 ± 12,04
M13	20,4 ± 3,35	79,1 ± 4,59	83,8 ± 18,82	20,4 ± 3,35	41 ± 2,82
M14	Na	20,3 ± 1,89	Na	Na	Nc
M	7,2 ± 0,22	7,9 ± 0,51	12,5 ± 0,41	7,2 ± 0,6	55,4 ± 4,19

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na); No citotóxico (Nc); No determinado (Nd); Miltefosina (M).

En estas Tablas se puede observar claramente la gran variación en la susceptibilidad a estos compuestos en las cuatro especies de *Leishmania*. Después del análisis comparativo de la susceptibilidad entre las especies de *Leishmania* evaluadas, se pudo observar que *L. infantum* es más susceptible que las especies cutáneas. Por el contrario, se observó que algunos compuestos solamente son activos frente a las especies cutáneas.

Tabla 51. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de compuestos derivados de oxoisoaporfina Series D (1 – 10), DIME (1 – 3), Me (1 y 3) y M (1 – 14).

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)				CC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	J774
AC1	14,3 ± 0,50	10,4 ± 0,35	18,9 ± 0,20	14,3 ± 0,50	Nc
AC2	3,7 ± 0,57	2,9 ± 0,21	3,4 ± 0,23	3,7 ± 0,57	11,7 ± 1,42
AC3	1,7 ± 0,13	0,9 ± 0,11	0,4 ± 0,05	1,5 ± 0,03	21 ± 4,85
AC4	1,6 ± 0,04	0,7 ± 0,03	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,02	17,9 ± 5,11
AC5	6,5 ± 0,35	6,1 ± 0,05	8 ± 0,12	7,8 ± 0,58	41,1 ± 13,71
AC6	1,6 ± 0,07	0,8 ± 0,02	1,2 ± 0,01	0,8 ± 0,03	8,8 ± 0,34
AC7	1,7 ± 0,09	0,5 ± 0,02	1,5 ± 0,07	0,6 ± 0,05	15,3 ± 3,83
AC1+	1 ± 0,10	0,2 ± 0,001	0,5 ± 0,05	0,3 ± 0,01	24,6 ± 4,13
AC2+	3,5 ± 0,08	1,9 ± 0,02	2,6 ± 0,19	2,3 ± 0,15	29,1 ± 3,87
AC3+	2,5 ± 0,16	1,3 ± 0,06	1,7 ± 0,07	1,5 ± 0,05	29,5 ± 2,98
AC4+	8,2 ± 0,06	5,1 ± 0,12	8 ± 0,17	5,7 ± 0,23	36 ± 7,04
AC5+	27,5 ± 0,17	22,4 ± 0,43	33 ± 1,34	19,6 ± 0,15	44,4 ± 4,50
AC6+	4,8 ± 0,14	2,9 ± 0,04	5,1 ± 0,10	3,4 ± 0,01	30 ± 8,52
AC7+	4,2 ± 0,38	2,1 ± 0,27	1 ± 0,12	3 ± 0,03	28,9 ± 4,47
M	7,2 ± 0,22	7,9 ± 0,51	12,5 ± 0,41	7,2 ± 0,6	55,4 ± 4,19

Concentración inhibitoria media (IC₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀); No activo (Na); No citotóxico (Nc); No determinado (Nd); Miltefosina (M).

Se han identificado 13 derivados de las oxoisoaporfina con actividad leishmanicida frente a las 4 especies de *Leishmania* evaluadas, que además no mostraron citotoxicidad. De este grupo de compuestos no citotóxicos se destacan los compuestos A4 y A8 (IC₅₀ 3,0 – 9,6 y 1,5 – 8,1 µg/mL respectivamente) por presentar actividad leishmanicida menor o comparable a la miltefosina. Asimismo, los compuestos OXO1, CA3 y AC1 (IC₅₀ 16,3 – 48,2; 8,4 – 24,0 y 10,4 – 18,9 µg/mL respectivamente), presentaron una moderada actividad en comparación con la miltefosina. Los compuestos A11, D4, D9, DIME2, M2, A7, A9 y A10 (IC₅₀ 21,2 – 36,9; 10,2 – 70,7; 17,6 – 34,2; 16,7 – 69,1; 25,3 – 45,2; 23,9 – 56,8; 13,8 – 77,2; 49,4 – 78,3 µg/mL respectivamente), mostraron una actividad leishmanicida muy variable entre las especies de *Leishmania*. Los compuestos OXO13, CA1, CA2, CA13, M8, AC3, AC4, AC7, AC1+, AC2+, AC3+ y AC7+, con actividad leishmanicida superior a la miltefosina, resultaron

citotóxicos, aunque presentaban un mejor índice de selectividad que la miltefosina.

Actividad leishmanicida de derivados de oxoisoaporfirinas sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania infantum* y *L. amazonensis*.

De los compuestos sometidos al cribado frente a promastigotes, se han seleccionado 4 (OXO-1, OXO13, A4 y A8), en base a su probada actividad frente a las 4 especies, ausentes de citotoxicidad e IC₅₀ similar o superior a la miltefosina, para su evaluación frente a amastigotes intracelulares de *L. infantum* y *L. amazonensis*.

Tabla 52. Actividad leishmanicida de derivados oxoisoaporfirinas en amastigotes intracelulares de *L. infantum* y *L. amazonensis*.

Compuestos	IC ₅₀ (µg/ml)	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
OXO-1	20,61 ± 1,17	56,4 ± 3,80
OXO-13	4,49 ± 0,64	3,27 ± 1,34
A4	15,3 ± 1,01	19,2 ± 1,24
A8	6,2 ± 0,41	8,8 ± 0,50
Miltefosina	20,9 ± 1,47	23,7 ± 1,78

Los resultados que se resumen en la Tabla 52, reflejan una importante variación en la susceptibilidad de las especies de *Leishmania* evaluadas frente a los compuestos seleccionados. Así, algunos aumentaron su actividad leishmanicida en las formas amastigotes intracelulares, destacando a los compuestos OXO-1 y A8 por ser más activos sobre *L. amazonensis* y al compuesto OXO-13 por ser más activo sobre *L. infantum*. En cambio, el compuesto A4 reduce su actividad frente a ambas especies de *Leishmania*.

ENSAYOS *IN VIVO*

También se evaluó la eficacia *in vivo* en un modelo de criceto dorado de leishmaniosis cutánea de una serie de formulaciones tópicas de anfotericina B, que fueron preparadas por el grupo del Dr. Torrado del Departamento de Tecnología Farmacéutica (UCM).

Actividad leishmanicida de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B en un modelo in vivo de leishmaniosis cutánea crónica en criceto dorado.

Se prepararon tres formulaciones de anB en estado monomérico de uso tópico: en gel, pomada y crema, empleando para la vehiculización γ -ciclodextrinas. La relación en los complejos de inclusión de anB/ γ -ciclodextrinas fue 1:100, siendo la concentración final de AnB de un 0,125%. En cuanto a los excipientes, el gel de AnB contenía ciclometicona y Dow Corning 3225C, en cambio la pomada de AnB contenía Orabase® y la crema de AnB contenía dimeticona y ciclometicona.

1) Formulación tópica en pomada en tratamiento corto

Se realizó un primer experimento, en el que se prepararon 2 grupos de 5 cricetos cada uno, el grupo control de infección no tratado y el grupo tratado con pomada de AnB monomérica. El experimento duró un total de 9 semanas. El establecimiento de la leishmaniosis cutánea crónica se alcanzó a las 4 semanas, cuando se hizo evidente la inflamación de la pata infectada, ya que mostraba una diferencia significativamente estadística en relación a la pata no infectada ($p < 0,05$). A día 28 post-infección se inició el tratamiento tópico, durante 4 días consecutivos, consistente en la aplicación directa de la pomada sobre la lesión. Para evitar contaminaciones con la cama de las jaulas los animales se mantuvieron aislados en jaulas con rejillas durante 2 horas. El progreso de la lesión inflamatoria se evaluó durante 4 semanas más, midiendo semanalmente el diámetro de las patas posteriores izquierda infectada y derecha no infectada, con la ayuda de un calibrador (*Vernier*

Caliper), hasta la finalización del experimento. El grado de la inflamación se determinó por la diferencia entre el diámetro de la pata infecta y la pata no infectada, y los resultados se recogen en la Tabla 53.

Durante el progreso de la inflamación hasta la cuarta semana, el diámetro de la inflamación del grupo a tratar era similar al del control de infección, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$). Por el contrario, después del período de tratamiento, el tamaño de la inflamación fue diferenciándose gradualmente entre ambos grupos, siendo menor en el grupo tratado con pomada de AnB (Fig. 57). Tras realizar un análisis estadístico no paramétrico (*Test de U-Mann-Whitney*) con los datos obtenidos en la última semana, se pudo observar que existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo no tratado y el grupo tratado con la pomada de AnB monomérica ($p < 0,05$).

Semanas	Diámetro de la inflamación (mm) \pm DS	
	Pomada de AnB	Control de Infección
0	0,2 \pm 0,59	0,7 \pm 0,41
1	0,1 \pm 0,34	0,0 \pm 0,61
2	0,3 \pm 0,29	0,7 \pm 0,32
3	1,9 \pm 0,37	2,1 \pm 0,37
4	2,5 \pm 0,37	2,7 \pm 0,61
5	3,0 \pm 0,52	3,5 \pm 0,25
6	3,2 \pm 0,52	4,5 \pm 1,28
7	3,3 \pm 0,62	4,5 \pm 0,88
8	3,5 \pm 0,50	4,7 \pm 1,06
9	3,6 \pm 0,45	5,3 \pm 1,04

Tabla 53. Evolución de la inflamación de las patas infectadas con *L. amazonensis*. Los valores representan el promedio del diámetro de la inflamación en milímetros (mm) del grupo que recibió el tratamiento tópico con AnB monomérica en pomada y el grupo control de infección no tratado.

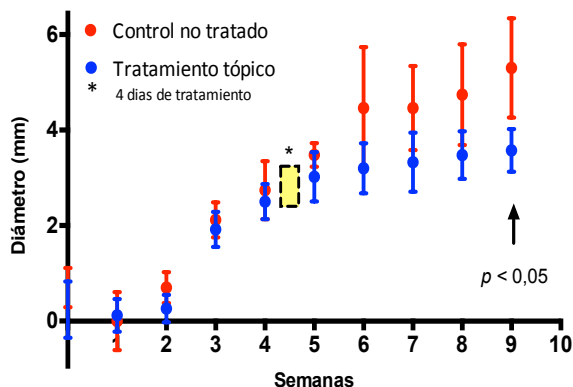


Fig. 57. Representación gráfica de la evolución de la lesión determinada por el diámetro (mm) de la inflamación de la pata derecha e izquierda de los cricetos tratados y no tratados, en un modelo de infección crónica. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante pruebas no paramétricas (*U-Mann-Whitney*) $p < 0,05$.

2) Formulación tópica en pomada y crema en tratamiento largo

En un segundo experimento, se prepararon 3 grupos de 6 cricetos cada uno, el primer grupo fue para el control de infección, el segundo grupo fue tratado con pomada de AnB monomérica y el tercer grupo fue tratado con crema de AnB monomérica. El experimento duró un total de 13 semanas. El establecimiento de la leishmaniosis cutánea crónica se alcanzó a las 4 semanas. A día 28 post-infección se inició el tratamiento tópico durante 28 días consecutivos y consistió en la aplicación directa de la crema y la pomada sobre la lesión durante 2 horas dejando a los animales aislados en jaulas con rejillas. El progreso de la lesión fue determinado semanalmente hasta la semana 13. Se midió el diámetro de la inflamación de la almohadilla plantar de las patas posteriores izquierda infectada y derecha no infectada con la ayuda de un calibrador (*Vernier Caliper*). La inflamación se determinó por la diferencia entre el diámetro de la pata infecta y la pata no infectada, y los resultados se recogen en la Tabla 54.

Durante las primeras 4 semanas de infección para el establecimiento de la enfermedad crónica, el progreso de la inflamación fue similar en los 3 grupos y no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Durante el período de tratamiento y al finalizar el mismo tampoco se evidenciaron diferencias en el progreso de la inflamación entre los grupos tratados con la pomada y crema respecto del control de infección (Fig. 58). Al finalizar el experimento el grupo tratado con la pomada de AnB presentó una leve disminución respecto al control de la infección, sin embargo tras realizar el análisis estadístico no paramétrico (*Test de U-Mann-Whitney*), no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Semanas	Diámetro de la inflamación (mm) \pm DS		
	Pomada de AnB	Crema de AnB	Control de infección
0	0,1 \pm 0,20	0,3 \pm 0,13	0,2 \pm 0,17
1	0,1 \pm 0,13	0,0 \pm 0,13	0,2 \pm 0,10
2	1,1 \pm 0,25	1,1 \pm 0,25	1,0 \pm 0,23
3	1,9 \pm 0,38	1,8 \pm 0,25	1,8 \pm 0,32
4	2,7 \pm 0,50	2,5 \pm 0,36	2,6 \pm 0,28
5	3,3 \pm 0,72	3,0 \pm 0,49	3,2 \pm 0,18
6	4,6 \pm 0,70	4,9 \pm 0,27	4,7 \pm 0,57
7	5,0 \pm 0,83	5,5 \pm 0,50	5,6 \pm 0,61
8	6,7 \pm 0,88	7,5 \pm 0,73	7,4 \pm 0,56
9	7,8 \pm 1,27	8,7 \pm 0,40	8,4 \pm 0,61
10	8,6 \pm 1,00	9,1 \pm 0,43	8,9 \pm 0,37
11	8,8 \pm 0,99	9,3 \pm 0,50	9,1 \pm 0,47
12	9,0 \pm 1,43	9,8 \pm 0,58	9,8 \pm 0,83
13	9,4 \pm 1,26	10,4 \pm 0,52	10,6 \pm 0,32

Tabla 54. Evolución de la inflamación de la pata infectada con *L. amazonensis*. Los valores representan el promedio del diámetro de la inflamación en milímetros (mm) de los grupos tratados con pomada y crema de AnB monomérica y el grupo control de infección no tratado.

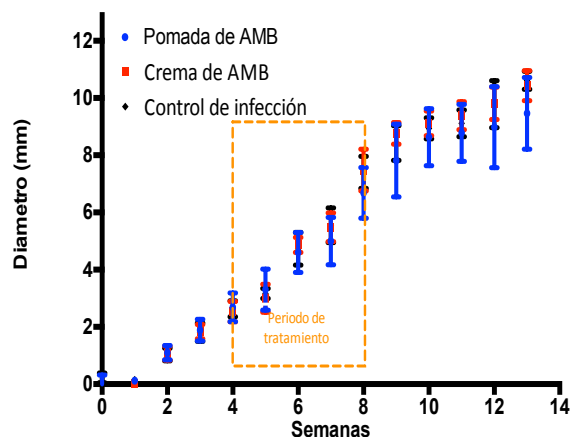


Fig. 58. Representación gráfica de la evolución de la inflamación, determinada por el diámetro (mm) de la pata infectada de los cricetos tratados con pomada y crema de AnB y el grupo no tratado. Las diferencias no significativas fueron determinadas mediante pruebas no paramétricas (*U-Mann-Whitney*) $p > 0,05$.

3) Formulación tópica en gel en tratamiento largo

En el tercer experimento, se prepararon 2 grupos de 6 cricetos cada uno, un grupo control de infección y el segundo recibió tratamiento tópico con gel de AnB monomérica. El experimento duró un total de 12 semanas, El establecimiento de la leishmaniosis cutánea crónica se alcanzó a las 4 semanas. A día 28 post-infección se inició el tratamiento tópico durante 21 días consecutivos y consistió en la aplicación directa del gel sobre la lesión 2 veces al día durante 2 horas, durante las cuales los animales fueron aislados en jaulas con rejillas para evitar el contacto con la cama de estas jaulas. El control final del progreso de la inflamación se realizó después de 5 semanas post tratamiento. El progreso de la hinchazón fue determinado midiendo el diámetro de la inflamación de la almohadilla plantar de las patas posteriores

izquierda infectada y derecha no infectada, semanalmente con la ayuda de un calibrador (*Vernier Caliper*), hasta la finalización del tratamiento. Seguidamente se continuó la evolución de la infección. La inflamación se determinó por la diferencia entre el diámetro de la pata infecta y la pata no infectada, y los resultados se recogen en la Tabla 55.

Semanas	Diámetro de la inflamación (mm) \pm DS	
	Gel de AnB	Control de Infección
0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
1	0,1 \pm 0,2	0,0 \pm 0,2
2	0,7 \pm 0,2	0,7 \pm 0,5
3	1,7 \pm 0,3	2,0 \pm 0,3
4	3,1 \pm 0,3	3,0 \pm 0,4
5	3,9 \pm 0,6	3,9 \pm 0,7
6	4,0 \pm 0,4	4,7 \pm 0,7
7	3,9 \pm 0,9	5,4 \pm 0,7
12	6,4 \pm 1,4	7,7 \pm 1,5

Tabla 55. Evolución de la inflamación de la pata infectada con *L. amazonensis*. Los valores representan el promedio del diámetro de la inflamación en milímetros (mm) del grupo que recibió el tratamiento tópico con AnB monomérica en gel y el grupo control de infección no tratado.

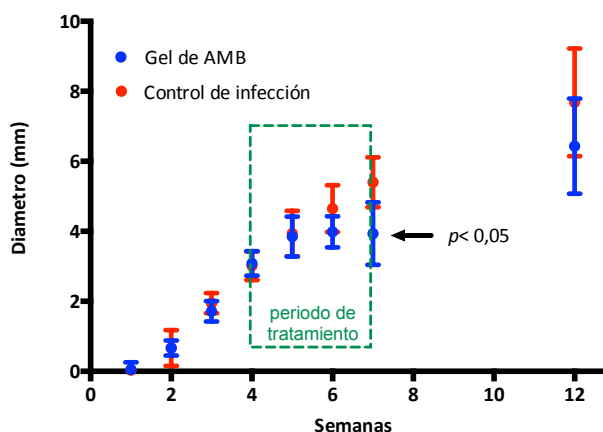


Fig. 59. Representación gráfica de la evolución de la inflamación, determinada por el diámetro (mm) de la pata infectada de los cricetos tratados con gel de AnB y no tratados. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante pruebas no paramétricas (*U-Mann-Whitney*) $p < 0,05$.

El progreso de la inflamación hasta la cuarta semana, era similar en ambos grupos, sin presentar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). En la segunda semana de tratamiento, el grupo tratado con el gel de AnB redujo significativamente el progreso de la inflamación y al finalizar el tratamiento en la tercera semana, la inflamación en el grupo tratado con el gel de AnB se había reducido significativamente ($p < 0,05$) en relación al grupo control, tal y como se puede evidenciar en la Fig. 57. Sin embargo, los datos obtenidos en la última semana, se demostraron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$) (*Test de U-Mann-Whitney*)

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En Bolivia, los antimoniales pentavalentes (comerciales y genéricos) son de primera elección en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea, mucocutánea, y visceral. A pesar de que no existen datos referenciales de resistencia a estos fármacos, en 1987, un estudio clínico notificó que el tratamiento con Glucantime® fue efectiva solamente en 88% de los pacientes con leishmaniosis cutánea y mucocutánea, procedentes del Departamento de La Paz (Desjeux et al. 1987). Otro ensayo clínico controlado en pacientes con leishmaniosis, procedentes del parque nacional “Isiboro Secure” del Departamento de Cochabamba, determinó que la tasa de curación alcanzaba el 94% en la leishmaniosis cutánea localizada y un 73% en la leishmaniosis mucocutánea con estibogluconato de sodio genérico (Bermudez et al. 2006). Por otro lado, los resultados de un amplio operativo de intervención en el Departamento de Cochabamba, determinó que la eficacia del tratamiento con antimoniales pentavalentes alcanzó una tasa de curación entre el 75% y 94% de los pacientes con leishmaniosis cutánea localizada (García et al. 2009).

La AnB en su forma comercial Fungizona® se constituye en la segunda alternativa en la terapia de la leishmaniosis crónica de pacientes con fallo terapéutico frente a los antimoniales pentavalentes. Se desconocen casos de resistencia, sin embargo están descritos fallos terapéuticos. Así, en un ensayo aleatorio de 10 pacientes hospitalizados con leishmaniosis mucocutánea, la tasa de curación fue del 90%, y solamente un paciente presentó recaída de la infección (Valda Rodríguez et al. 1995). Otro estudio clínico supervisado en pacientes con leishmaniosis mucocutánea crónica determinó que la tasa de curación alcanzó el 50% de los pacientes tratados (Soto et al. 2007).

Por otra parte, y a pesar de que la miltefosina está aprobada para su uso terapéutico en Bolivia, solamente fue utilizada en ensayos clínicos para determinar su eficacia en pacientes con leishmaniosis cutánea y mucocutánea.

Los resultados son muy variados con tasas de curación entre el 58% a 91% de los pacientes (Soto et al. 2007; Soto et al. 2008; Soto et al. 2009).

La falta de acceso a los medicamentos convencionales y su elevado coste económico que supone para la población de escasos recursos, ha llevado a los pobladores a recurrir a los tratamientos de la medicina tradicional propios de los “originarios” de la región. En Bolivia está ampliamente extendido el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades, y la leishmaniosis no es la excepción. En regiones endémicas de leishmaniosis, los “originarios” de las etnias Tacana, Chiman y Mosekene continúan usando los extractos de “Evanta” o *Galipea longiflora*, en forma de cataplasma y brebajes por vía oral como tratamiento natural de la leishmaniosis (Bourdy et al. 2000). La actividad y eficacia leishmanicida de los extractos y metabolitos purificados de esta planta han sido demostrados tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Fournet et al. 1993; Fournet et al. 1994; Fournet et al. 1996; Giménez et al. 2005).

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* A LOS FÁRMACOS DE REFERENCIA.

Los antecedentes en cuanto a la variable eficacia y los fallos terapéuticos en el tratamiento de la leishmaniosis en Bolivia, justifican el examen detallado en modelos de estudio controlado de la susceptibilidad de los aislados bolivianos a los tratamientos convencionales Fungizona®, miltefosina y al extracto total de alcaloides de Evanta (CAT-E8).

Para identificar la variación intrínseca de los aislados hemos incorporado cepas de referencia disponibles en nuestro laboratorio. La IC_{50} fue utilizada como indicador de la susceptibilidad basal de los parásitos a un determinado fármaco (Ringwald et al. 2005). Cabe mencionar que en este trabajo no se pudo determinar la susceptibilidad frente a los antimoniales pentavalentes, ya que las formas promastigotes de los aislados de *Leishmania* no fueron susceptibles a concentraciones de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados de este estudio confirman las variaciones intrínsecas en la susceptibilidad a los tratamientos convencionales entre las especies circulantes en la región. Aunque algunos autores consideran que la susceptibilidad *in vitro* no es determinante en la identificación de resistencia (Yardley et al. 2005), otros estudios identificaron la correlación entre la baja susceptibilidad *in vitro* y el fallo terapéutico o resistencia al tratamiento (Bhandari et al. 2012; Fernandez et al. 2012). Por lo que los resultados de este trabajo, podría constituirse en un aporte significativo en la terapia clínica de la enfermedad, especialmente durante el seguimiento y selección del tratamiento.

Tal y como se puede apreciar en los resultados expresados en la Fig. 53 de este capítulo, los aislados del complejo *L. (L.) mexicana*, fueron los más susceptibles a todos los tratamientos.

Frente a la miltefosina, los aislados del complejo *L. (L.) mexicana* (IC₅₀ 0,86 – 6,25 µg/mL) y *L. (V.) lainsoni* (IC₅₀ 3,13 – 7,71 µg/mL) resultaron ser significativamente más susceptibles que los aislados de *L. (V.) braziliensis* (IC₅₀ 9,60 – 30,56 µg/mL). Además, los aislados del complejo *L. (L.) mexicana* también fueron más susceptibles que la cepa de referencia *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/79/MARIA).

En la literatura se pueden encontrar trabajos de susceptibilidad *in vitro* frente a promastigotes de diferentes especies de *Leishmania*. Gaunguly y colaboradores comunicaron que la susceptibilidad *in vitro* de promastigotes de *L. (L.) amazonensis* (MORY/BR/72/M184) y *L. (L.) mexicana* (LV4), frente a la miltefosina, fue de 4,99 y de 11,21 µg/mL (expresado como IC₅₀) respectivamente (Ganguly et al. 2006). Por otra parte, Escobar y colaboradores estimaron la susceptibilidad de la cepa de referencia *L. (L.) mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21) en el rango de IC₅₀ comprendida entre 2,37 – 12,71 µg/mL (Escobar et al. 2002). En cambio, un estudio realizado en aislados de *Leishmania* del Perú, determinó que la susceptibilidad, a la miltefosina, de los amastigotes intracelulares del aislado 068 de *L. (L.) mexicana* era superior a 30

µg/mL (Yardley et al. 2005). La alta sensibilidad *in vitro* a la miltefosina de los aislados bolivianos de *L. (L.) mexicana* podría ser un indicador de la eficacia en la terapia de la leishmaniosis debida a la infección por los parásitos de este complejo. Estudios experimentales *in vivo* en el modelo murino, determinaron que la miltefosina es capaz de erradicar la infección en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa), cuando recibían tratamiento a las dosis de 20, 30, 40 y 50 mg/Kg durante 21 días (Godinho et al. 2012). Sin embargo, en otro estudio *in vivo* también en ratones BALB/c, infectados con *L. mexicana*, solo se obtuvo la cura parasitológica del 50 al 60% de los ratones que recibieron tratamiento de 20 mg/Kg durante 21 días (Serrano-Martín et al. 2009). Por otro lado, la gran variabilidad en la susceptibilidad a la miltefosina de los aislados caracterizados como *L. (V.) braziliensis*, podría ser un indicador de resistencia.

En cuanto al origen de las muestras, la mayoría de estos aislados procedían de pacientes con lesiones cutáneas. Solamente tres fueron obtenidas de pacientes con lesiones mucocutáneas, entre las cuales se encuentra el aislado INL-518-10 caracterizado como *L. (V.) braziliensis*. Este aislado fue el menos susceptible a la miltefosina de todos los aislados evaluados, presentando un IC₅₀ de 30,56 µg/mL (74,8 µM) que, en comparación con la cepa de referencia *L. (V.) braziliensis* M2903, que presentó un IC₅₀ de 7,28 µg/mL (17,8 µM), resultó ser cuatro veces menor. Los otros 2 aislados procedentes de lesiones mucocutáneas, INL-466-10 e INL-626-10, presentaron un IC₅₀ de 20,54 y 17,93 µg/mL respectivamente, 3 y 2 veces mayor al de la cepa de referencia.

La baja susceptibilidad a la miltefosina de *L. (V.) braziliensis* también ha sido comunicada por Yardley y colaboradores en un estudio *in vitro*, frente a las formas amastigotes intracelulares de aislados peruanos, mostrando un IC₅₀ entre 21,3 a >30 µg/mL (Yardley et al. 2005). Algunos autores recomiendan no correlacionar la susceptibilidad *in vitro* con la eficacia terapéutica, ya que la respuesta clínica a los tratamientos involucra múltiples factores fisiológicos que

condicionan los grados de eficacia terapéutica. Sin embargo, nuestro interés es identificar si la resistencia es debida intrínsecamente a la interacción directa entre el parásito y el fármaco. Casualmente, los estudios clínicos realizados en la comunidad de Palos Blancos del Departamento de La Paz Bolivia (donde la prevalencia de *L. (L.) braziliensis* es predominante), determinaron que la eficacia del tratamiento con miltefosina en pacientes con leishmaniosis mucocutánea había alcanzado una tasa de curación que variaba entre el 58 y 83% (Soto et al. 2007). Otro estudio, en Guatemala, determinó una tasa de curación de tan solo el 33%, en pacientes con leishmaniosis cutánea debida a *L. (V.) braziliensis*, después de la administración de 2,5 mg/Kg durante 28 días (Soto et al. 2004). En Brasil se alcanzó una tasa de curación del 75% en pacientes con leishmaniosis cutánea debida a la infección por *L. (V.) braziliensis*, después de la administración de 2,5 mg/Kg de miltefosina durante 28 días consecutivos (Machado et al. 2010). Por tanto, todos estos estudios coinciden en la menor eficacia del tratamiento con miltefosina en la leishmaniosis por *L. (L.) braziliensis*.

Con el objetivo de identificar las causas que asocian a *L. (V.) braziliensis* con la baja susceptibilidad, algunos estudios han sugerido que en *L. (V.) braziliensis* podría estar disminuida la expresión del complejo de proteínas transportadoras LbMT/LbRos3 en la membrana plasmática de este parásito, con la consiguiente disminución en la acumulación de miltefosina en su interior (Sánchez-Cañete et al. 2009). Además, recientemente un estudio realizado en aislados de *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis*, de pacientes que no respondieron al tratamiento con miltefosina, demostró que el perfil de expresión de las proteínas transportadoras ABCA3 de estos parásitos era inversamente proporcional a la sensibilidad *in vitro* frente a la miltefosina (Obonaga et al. 2013).

Frente al extracto total de alcaloides “Evanta” CAT-E8, al igual que frente a la miltefosina y Fungizona®, el patrón de susceptibilidad de los aislados del complejo *L. (L.) mexicana* fue mayor que para la cepa de referencia *L. (L.) amazonensis*. En cambio, los aislados de *L. (V.) braziliensis*, en su mayoría, fueron

menos susceptibles, que la cepa de referencia de *L. (V.) braziliensis*. Es importante resaltar que la actividad leishmanicida de la Evanta es mayor que la de la miltefosina, con variaciones mínimas entre los diferentes aislados de cada especie.

Galipea longiflora “Evanta” es una rutácea que produce diversos alcaloides cuya actividad leishmanicida, ha sido previamente demostrada por otros autores en modelos *in vitro* frente a formas promastigotes de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) donovani* con IC₉₀ de 25 a 100 µg/mL, y en un modelo *in vivo* la eficacia de los metabolitos purificados 2-n-pentil quinolina y 2-fenil quinolina en ratones BALB/c infectados con *L. (L.) amazonensis* (Fournet et al. 1994). En la medicina tradicional, para el tratamiento de la leishmaniosis, se emplea la corteza fresca o seca molida, bien aplicada directamente en forma de cataplasma sobre las úlceras o junto con el consumo, en forma de infusiones, durante tres días. Más recientemente se han llevado a cabo estudios clínicos, promovidos desde la Universidad Mayor de San Andrés (Bolivia), en los que se han empleado formulaciones tópicas en pomada y formulaciones orales en jarabe (Giménez et al. 2005).

NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

Actualmente, los medicamentos disponibles para la terapéutica de la leishmaniosis no han conseguido controlar la enfermedad ni erradicar al parásito. Este fracaso se ha asociado a múltiples factores: como la falta de acceso a los medicamentos, los fallos terapéuticos o las resistencias adquiridas, a lo que hay que sumar la severidad de los efectos adversos de los tratamientos convencionales. Por todo ello es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que sean más seguras, menos invasivas y más eficaces. En este contexto, se está trabajando en la elaboración de nuevas formulaciones que disminuyan los efectos adversos y faciliten la administración de los medicamentos ya existentes, principalmente a partir de los antimoniales

pentavalentes encapsulados en liposomas o formando complejos con β -ciclodextrinas (Frézard et al. 2000; Demicheli et al. 2004; Frézard et al. 2004; Martins et al. 2006) así como de AnB formulada en complejos lipídicos (Adler - Moore & Proffitt 2008), liposomas (Sundar et al. 2001a) y dispersiones coloidales (Guo et al. 1991), entre otras.

También se están buscando nuevos compuestos con actividad leishmanicida, entre compuestos con mecanismos de acción conocidos y obtenidos a partir de complejas librerías químicas (Siqueira-Neto et al. 2010) o bien nuevas entidades químicas obtenidas a partir de síntesis química como las sulfonamidas (Dea-Ayuela et al. 2009), alcaloides (Gopinath et al. 2013; Sobarzo-Sánchez et al. 2013), benzotiofenos (Bonano et al. 2013) y aril-pirimidina (Suryawanshi et al. 2013), entre otros.

Alternativamente, también se están buscando nuevos metabolitos activos frente a *Leishmania* obtenidos de productos naturales, como aceites esenciales de *Bixa orellana* (Monzote et al. 2013), alcaloides de *Galipea longiflora* (Fournet et al. 1996), ácido benzoico de *Piper spp.* (Flores et al. 2009), sesquiterpenos-lactonas de *Acanthospermum hispidum* D.C. (Ganfón et al. 2012), flavonoides de *Consolida oliveriana* (Marín et al. 2009) y otros muchos extractos de plantas usadas en la medicina tradicional de diferentes regiones del mundo (Braga et al. 2007; Sharma et al. 2009).

Un enfoque multidisciplinar para el descubrimiento de nuevos fármacos, implica la identificación de compuestos potencialmente activos, la síntesis química total y su posterior formulación farmacéutica. En este capítulo, hemos centrado el estudio en la evaluación de la eficacia *in vitro* e *in vivo* de nuevas formulaciones farmacéuticas de AnB, nuevos compuestos de síntesis química y la identificación de extractos, fracciones y metabolitos obtenidos de plantas medicinales.

ANFOTERICINA B

La AnB comercial (Fungizona®) es un fármaco con potencial eficacia frente a infecciones fúngicas y parasitarias, sin embargo su toxicidad y baja absorción intestinal limitan sus aplicaciones terapéuticas. Para disminuir sus efectos adversos, alternativamente se han propuesto diferentes formulaciones que básicamente son inclusiones en complejos lipídicos (Abelcet®), en liposomas (AmBisome®) y en dispersiones coloidales (Amphocil® y Amphotec®) (Hamill 2013). Sin embargo, su elevado coste no permite el acceso a estos medicamentos a población de los países en vías de desarrollo donde la leishmaniosis es endémica *Leishmania* (WHO 2010c; Roy et al. 2012).

En los últimos años, grupos de investigación del Departamento de Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universidad Complutense de Madrid, en trabajo conjunto vienen desarrollando y evaluando formulaciones farmacéuticas de AnB encapsuladas en polilactatos y microesferas de albúmina como alternativas para el tratamiento de la leishmaniosis visceral debida a la infección por *L. (L.) infantum* (Dea-Ayuela et al. 2004; Sanchez-Brunete et al. 2004; Ordoñez-Gutierrez et al. 2007; Espada et al. 2008b). En este trabajo, hemos ampliado el estudio frente a especies cutáneas y mucocutáneas con alta prevalencia en el Nuevo Mundo. Para este propósito, inicialmente hemos evaluado la actividad leishmanicida de los diferentes estados de agregación (monomérica, dimérica y poliagregados) de AnB en sus formas libres y encapsulados en microesferas de albúmina, además de una formulación en gel de AnB en el modelo *in vitro* frente a promastigotes y amastigotes intracelulares de especies cutáneas y viscerales de *Leishmania*, evaluándose a continuación la eficacia de 3 formulaciones tópicas de AnB en un modelo *in vivo* de leishmaniosis cutánea crónica.

El resultado de la actividad *in vitro* de la AnB en sus estados monomérico y dimérico libres, encapsulados en microesferas de albúmina y en gel de γ -CD, frente a promastigotes de las 4 especies de *Leishmania*, fue comparable con la

actividad del deoxicolato de AnB y la Fungizona®, en cambio la AnB en su estado poliagregado libre y encapsulado en microesferas de albúmina resultó mucho menos activo especialmente frente a *L. (L.) amazonensis* (ver Tabla 36 de este capítulo). Estos resultados difieren de los comunicados previamente por Ordoñez y colaboradores sobre promastigotes de *L. infantum* (UCM20), quienes determinaron que las formas monomérica, dimérica y poliagregada libre de AnB no presentaban actividad, en cambio las formulaciones encapsuladas en microesferas de albúmina eran muy activas incluso a concentraciones de IC₅₀ de 0,2 µg/mL (Ordoñez-Gutierrez et al. 2007). Similares diferencias en la susceptibilidad *in vitro* frente a la Fungizona® en aislados de *L. (L.) infantum* también fueron descritos por Piñero y colaboradores, quienes encontraron una variación entre 3,2 a 72 µg/mL (Piñero et al. 2002). Por otra parte, un reciente estudio realizado en aislados de *L. (L.) infantum* detectó menos variación en la susceptibilidad *in vitro* y (comprendida en el rango de 0,023 a 0,66 µg/mL) frente a la Fungizona® (Maia et al. 2013); resultados comparables a los obtenidos en nuestro trabajo.

Los efectos citotóxicos de la AnB generalmente parecen deberse a daños a nivel de la membrana celular con pérdida de la permeabilidad celular y liberación de K⁺ intracelular (Brajtburg et al. 1984; Brajtburg et al. 1990), además del incremento en la concentración de Ca⁺² intracelular (Sabra & Branch 1992). En nuestro experimento, la citotoxicidad en células J774 fue directamente dependiente del estado de agregación de la AnB. Así, la AnB poliagregada fue menos citotóxica que la dimérica y monomérica respectivamente (Fig. 60). Sin embargo, el gel de AnB monomérica con γ-CD, muestra una notable disminución de los efectos citotóxicos respecto de la AnB monomérica en su estado libre y encapsulado en microesferas de albúmina, ésta disminución es 7 y 19 veces menor en relación a la Fungizona® y al deoxicolato de AnB respectivamente.

Estudios anteriores, habían descrito diferencias en la capacidad hemolítica entre las formas oligoméricas (dimérica) y poliagregadas (Legrand et al. 1992).

También determinaron que la γ -CD no es citotóxica a concentraciones incluso de 2000 $\mu\text{g/mL}$ sobre una línea celular HCE (células epiteliales derivados de la córnea humana) (Saarinen-Savolainen et al. 1998). Asimismo, otros autores observaron que los efectos de la AnB, están en relación directa con la concentración de lípidos de membrana y su acción en la permeabilidad de la membrana (Bolard et al. 1991). Además, se ha determinado que cuanto mayor sea el tamaño del poro de los canales iónicos de AnB, la afluencia de agua en las células será más rápida, conduciendo a efectos citotóxicos (Yang et al. 2013b).

Las formas de AnB poliagregada libre y encapsulada en microesferas de albúmina, que fueron menos citotóxicas, también fueron descritas previamente (Espada et al. 2008a). A este respecto, Legrand y colaboradores atribuyen la disminución de la citotoxicidad a la baja solubilidad de la AnB poliagregada (Legrand et al. 1992). También, podríamos sugerir que la disminución de la citotoxicidad *in vitro* es debida a la caótica conformación estructural de la AnB poliagregada que reduciría la capacidad de interacción con el colesterol de la bicapa lipídica, impidiendo la formación de poros en la membrana celular (Gruda et al. 1988; Legrand et al. 1992; Espada et al. 2008a). A pesar de que no hemos encontrado disminución de la citotoxicidad de las formulaciones encapsuladas en el modelo *in vitro*, en estudios *in vivo* se determinó que la encapsulación en microesferas de albúmina reduce la toxicidad de la AnB (Sanchez-Brunete et al. 2004), lo que podría atribuirse a la formación de complejos con los constituyentes plasmáticos (Cheron et al. 2003). También es importante resaltar que las microesferas de albúmina y las γ -CD no mostraron ninguna actividad leishmanicida ni citotoxicidad celular a las concentraciones máximas evaluadas (100 $\mu\text{g/mL}$).

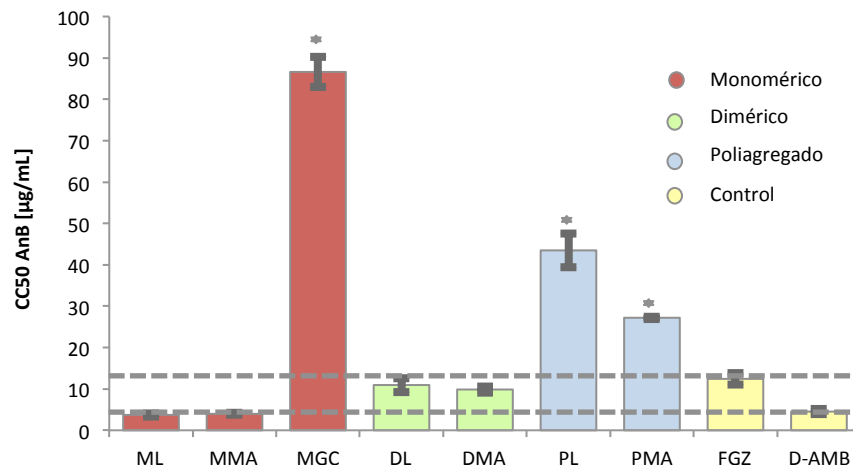


Fig. 60. Citotoxicidad celular en macrófagos J774 de las formulaciones de anfotericina B. Monomérico libre (ML); Monomérico encapsulado en microesferas de albúmina (MMA); Monomérico γ -CD en gel (MGC); Dimérico libre (DL); Dimérico encapsulado en microesferas de albúmina (DMA); Poliagregado libre (PL); Poliagregado encapsulado en microesferas de albúmina; Fungizona® (Fgz); Deoxicolato de AnB (AnB-D); *citotoxicidad estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0,001$).

En el modelo *in vitro* para la determinación de la actividad leishmanicida en amastigotes intracelulares, las formulaciones de AnB encapsuladas en microesferas de albúmina incrementan notablemente su actividad. En efecto, estos resultados son concordantes con los descritos previamente por Ordoñez y colaboradores, (Ordoñez-Gutierrez et al. 2007). Además se ha propuesto que la AnB podría activar el estallido respiratorio en la célula hospedadora, aumentando la actividad leishmanicida (Mukherjee et al. 2010). Dada la reducida actividad leishmanicida de la AnB poliagregada frente a las formas promastigotes y la disminución significativa de la citotoxicidad celular, sea en su estado libre o encapsulados en microesferas de albúmina, el incremento de su actividad leishmanicida frente a amastigotes intracelulares, podría deberse a la mayor susceptibilidad en la captación celular de las formas poliagregadas (Cheron et al. 2003). Además, en el espacio intracelular, podrían interaccionar con mecanismos químico-enzimáticos capaces de disgregarlos en dímeros o monómeros de AnB, capaces de una interacción directa con el ergosterol de membrana de los

amastigotes intracelulares. Por lo que es necesario continuar los estudios para determinar los estados de agregación al interior de la célula hospedadora. Sin embargo, independientemente del estado de agregación, otros autores también han descrito que la Fungizona®, AmBisome® y otras formulaciones de AnB son más activa en amastigotes intracelulares (Yardley & Croft 1997; Golenser et al. 1999; Kumar et al. 2009).

La leishmaniosis cutánea (LC) se caracteriza por desarrollar la sintomatología en el sitio mismo de la infección, aunque en los casos más graves puede llegar a metastatizar a ganglios linfáticos, mucosas y medula ósea (Romero et al. 2001). En el caso de las lesiones cutáneas localizadas, el tratamiento tópico es muy atractivo desde el punto de vista farmacoterapéutico ya que disminuiría los efectos adversos y el riesgo de complicaciones de los tratamientos sistémicos. Las formulaciones tópicas ofrecen significativas ventajas frente a la terapia sistémica tradicional, tales como fácil administración, menos efectos adversos y reducido coste en cuanto a los servicios clínico-hospitalarios (Garnier & Croft 2002).

Se han descrito formulaciones de AnB de uso tópico para el tratamiento sobre las membranas mucosas del ojo, boca, tracto respiratorio y digestivo, generalmente en combinación con algunos excipientes (Aerdts et al. 1991; Pleyer et al. 1992; Lotery et al. 1994; Bent & Kuhn 1996). Entre ellas se han descrito las ciclodextrinas, que han sido ampliamente utilizadas como solubilizantes y que además tienen la capacidad de formar complejos y pueden influir positivamente en la inclusión a través de la piel de ciertos compuestos activos (Klang et al. 2010).

En modelos *in vitro* se ha demostrado que las γ -CD son fuertes activadores de la permeabilidad cutánea (Klang et al. 2012). Esta acción, estaría mediada por la captación y entrega de AnB mediante la formación de complejos de inclusión por fuerzas de Van Der Waals e interacciones electrostáticas (He et al. 2013). Recientemente se ha descrito una formulación estable de AnB en complejos de

γ -CD en un colirio para el tratamiento de las infecciones fúngicas oculares, que en el modelo *in vitro* demostró una mayor eficacia que la Fungizona® frente a *Candida albicans* (Serrano et al. 2012).

La notable actividad leishmanicida y la drástica disminución de los efectos citotóxicos de la formulación de AnB monomérica en complejo de inclusión con γ -CD observada en el modelo *in vitro*, junto a los antecedentes descritos por otros autores respecto a la solubilidad a nivel cutáneo, nos llevó a evaluar la eficacia de tres formulación de AnB monomérica en complejos de inclusión γ -CD en gel, pomada y crema (con 12,5 g de γ -CD y 0,125 g de AnB monomérica) en un modelo de leishmaniosis cutánea crónica en el criceto dorado infectado con *L. (L.) amazonensis*.

La infección en la almohadilla plantar en el criceto dorado o en ratones BALB/c, es ampliamente utilizado como modelo de evaluación de la terapia experimental frente a leishmaniosis cutánea (Wilson et al. 1979; Sinagra et al. 2007; Peloi et al. 2011; Gomes-Silva et al. 2013). En el presente trabajo, en los 3 experimentos realizados, el tratamiento tópico se inició después de la cuarta semana post-infección. Las formulaciones en gel, pomada y crema de AnB fueron aplicadas directamente en el sitio de la lesión. Considerando que la infección en el modelo *in vivo* puede ser muy variable, en nuestro estudio hemos conseguido que el modelo de leishmaniosis cutánea crónica fuese bastante reproducible y homogénea en los tres experimentos. En los grupos de cricetos utilizados como controles de infección, se observó que el progreso de la lesión es irreversible, llegando a metastatizar a otras extremidades después de 15 semanas post infección, por lo que es de gran utilidad para evaluar la eficacia en la terapéutica de la leishmaniosis.

El criceto dorado es particularmente susceptible a la leishmaniosis con una compleja interacción parásito-hospedador. No desarrollan una respuesta inmune celular definida y la enfermedad visceralizante puede causar la muerte de los animales en unos meses sin interferencia del sistema inmunitario (Cuba Cuba

2000). Antes de iniciar los tratamientos (cuarta semana post-infección), el progreso de la lesión varió entre 2,5 – 2,7; 2,5 – 2,7 y 3,0 – 3,1 y mm de diámetro en el primer, segundo y tercer experimento respectivamente.

En los resultados del primer y segundo experimento, donde se evaluó la eficacia de la pomada de AnB con diferentes tiempos y protocolos de tratamiento, se pudo observar que en el grupo tratado durante cuatro días consecutivos, el progreso de la lesión disminuyó más del 30%. En cambio, en el grupo tratado durante cuatro semanas diariamente, mostraba solo una disminución del 11% al finalizar el experimento, a la novena y décimo tercera semana respectivamente. Estas discrepancias podrían deberse a las diferencias en los protocolos de tratamiento empleados. En el tratamiento de 4 días durante dos horas en aislamiento, la lesión fue protegida con un apósito. En el segundo experimento se aumentó el número de días de tratamiento con el fin de aumentar la eficacia, pero no se les puso un apósito a los animales, ya que en el primer experimento los animales se lo habían arrancaban. Al aumentar el número de días de tratamiento se esperaba incrementar la eficacia, sin embargo no fue así, ya que posiblemente el apósito que se había utilizado en el primer experimento había favorecido que la pomada se mantuviera de una forma más adecuada sobre la lesión.

En el segundo experimento, en el que se empleó el tratamiento con crema de AnB no se observó eficacia en cuanto a la reducción del tamaño de la lesión en comparación con el grupo control no tratado.

En los resultados del tercer experimento, donde se evaluó la eficacia del tratamiento con gel de AnB durante 3 semanas, la reducción de la lesión fue del 27% en comparación con el grupo de cricetos no tratados, al finalizar el tratamiento. Sin embargo, la diferencia en la disminución post tratamiento se redujo al 16% al finalizar el experimento en la décimo segunda semana. El protocolo de tratamiento fue similar al segundo experimento.

Aunque no se consiguió eliminar la infección, se puede considerar que la eficacia de la pomada (tratamiento corto) y el gel de AnB fueron medianamente moderados, considerando que el tratamiento tópico en la pata del criceto fue muy difícil de controlar por el movimiento natural del animal. Sin embargo, lo más importante es que se ha conseguido una formulación tópica de AnB con eficacia que podría ser una potencial alternativa para el tratamiento de las lesiones en la leishmaniosis cutánea localizada. En estudios posteriores, debería considerarse el sitio de infección para una mejor aplicación tópica que permita un mayor tiempo de interacción entre la lesión y el medicamento. Estos resultados preliminares deberán ser considerados, dada la dificultad de la vía tópica para la administración de medicamentos, al tener que superar una serie de barreras naturales tales como el estrato córneo y el epitelio pigmentario de la epidermis; el estrato germinativo, el musculo erector piloso, la glándula sebácea y el folículo piloso de la dermis (Garnier & Croft 2002).

Con el mismo objetivo, otros estudios evaluaron la eficacia de formulaciones lipídicas de AnB (Fungizona® en micelas, Amphocil® en colesteryl sulfato y ABPLC-AnB en complejo fosfolipídico) en ratones CBA infectados con *L. (L.) major*, sin conseguir resultados favorables (Frankenburg et al. 1998). En cambio, se ha propuesto una formulación tópica de AnB liposomal con eficacia similar al tratamiento con Glucantime intralesional, en pacientes con leishmaniosis cutánea (56,4% frente a 67,6%), sin que ocasione ningún efecto adverso, aunque la producción es muy costosa y complicada (Layegh et al. 2011). Convencidos de que es posible un tratamiento tópico, otros investigadores han conseguido llegar a la fase de ensayos clínicos 1 y 2 de una formulación tópica en crema de AnB al 3% denominado “*Anfoleish*”. Los primeros resultados de ese estudio patrocinado por DNDi podrían ser publicados en 2014 (Referencia: **NCT01845727**).

Entre todos los principios activos probados, los ensayos clínicos con la paromomicina han demostrado eficacia en la leishmaniosis cutánea y visceral del Viejo Mundo (Sinha et al. 2011). Sin embargo la formulación tópica en ungüento

por si sola, demostró ser solo ligeramente eficaz, con una tasa de curación del 16,6%, en pacientes del Viejo Mundo (Faghihi & Tavakoli - kia 2003). Por otra parte, en la leishmaniosis cutánea del Nuevo Mundo los resultados tampoco son alentadores, ya que un estudio en Brasil evidenció que solamente un 21,4% de los pacientes consiguieron curarse después de seguir el tratamiento con una formulación tópica de paromomicina durante 20 días (Santos et al. 2008).

DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINALES

Cada día es mayor el interés en la búsqueda de principios derivados de productos naturales con propiedades terapéuticas tanto frente a diferentes enfermedades infecciosas, como a patologías no infecciosas (Newman & Cragg 2012). En la terapéutica de la leishmaniosis, se han descrito muchas plantas con actividad en modelos *in vitro* e *in vivo*. A pesar del enorme potencial de algunos compuestos aislados de plantas medicinales, hasta el momento ningún producto ha sido evaluado en fase de ensayos clínicos para el tratamiento de la leishmaniosis, por lo que es importante continuar la búsqueda de nuevos productos derivados de plantas medicinales con potencial actividad leishmanicida.

Piper spp.

A partir de los conocimientos de la medicina tradicional, numerosas investigaciones han volcado su interés en la identificación de las propiedades terapéuticas de los productos naturales derivados de varias especies del género *Piper*. Mediante estudios fitoquímicos se han identificado diferentes metabolitos secundarios tales como alcaloides, amidas, propenilfenoles, lignanos, terpenos, flavonoides, chalconas y derivados del ácido benzoico, entre otros (Parmar et al. 1997), con actividad antioxidante (Choudhary & Kale 2002), ansiolítica (Lehrl 2004), antiinflamatoria (Sunila & Kuttan 2006), antibacteriana (Felipe et al. 2008), antifúngica (Xu & Li 2011) y antiparasitaria (Braga et al. 2007; Flores et al. 2009).

En Bolivia se han descrito más de 35 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales cuyo uso en la medicina tradicional está dirigido al tratamiento de las enfermedades parasitarias (Flores et al. 2008) y actualmente se continúan identificando más especies de *Piper* distribuidas en estas regiones. En este contexto, el Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas de la UMSA en colaboración con el Instituto Universitario de Bio-orgánica “Antonio González” de la ULL vienen realizando los estudios fitoquímicos de las especies de *Piper* distribuidas en Bolivia. Nuestra participación se encaminó a identificar la actividad leishmanicida de los extractos, fracciones y metabolitos activos de *P. divaricatum*, *P. braziliensis*, *P. reticulatum*, *P. bartlingianum*, *P. pseudoarborescens*, *P. strigosum* y *P. delineatum* frente a diferentes especies de *Leishmania*. Los resultados de la Tabla 38, claramente evidencian que la actividad leishmanicida de las diferentes especies de *Piper* son muy variables entre sí, siendo más activos los extractos de *P. divaricatum* y *P. pseudoarborescens*, mientras que *P. braziliensis* es escasa y selectivamente activo frente a las especies de *Leishmania* evaluadas. Además, cabe resaltar que los extractos diclorometano fueron los más activos frente a todas las especies de *Leishmania* estudiadas, por lo que el fraccionamiento de metabolitos secundarios para identificar el principio activo responsable de esta acción, se realizó a partir de este extracto. Sin embargo, la alta actividad de la fracción acetato de etilo de *P. delineatum*, determinó que también se continuara el fraccionamiento de metabolitos a partir de esta fracción.

Piper delineatum

A partir de las subfracciones diclorometano y acetato de etilo, con actividad leishmanicida, se identificaron metabolitos con actividad superior al fármaco de referencia miltefosina. Estos se corresponden con derivados de las chalconas: pdP1 (2',4',3-Trihidroxi-6'-metoxi-chalcona), pdP2 (2',4',3-Trihidroxi-6',5-dimetoxi-chalcona), pdP5 (2',3-Dihidroxi-4',6',5-trimetoxi-chalcona), pdP23 (cardomomin), pdP38 (2',3'-dihidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona) y pdP47 (2'-hidroxi-

3,4',6'-trimetoxi-chalcona) con IC_{50} menores a 3 $\mu\text{g/mL}$ y una dihidrochalcona pdP37 (uvangoletin), con IC_{50} entre 13 a 18,1 $\mu\text{g/mL}$, tal y como se describe en la Tabla 40 de este capítulo. Las chalconas pdP5 y pdP23 también resultaron bastante activas frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum* (IC_{50} 4,83 y 1,94; 2,59 y 1,79 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Las chalconas pdP1, pdP2 y pdP5 se corresponden con nuevas estructuras no descritas en la literatura, en cambio las chalconas pdP23, pdP38 y pdP47 fueron descritas previamente por otros autores, si bien sus propiedades leishmanicidas no se habían evaluado.

Muchos estudios han demostrado que compuestos del grupo de las chalconas son una alternativa terapéutica de mucho interés en la leishmaniosis. En este sentido, se ha descrito la “licochalcona A”, aislada de las raíces de *Chinesse liquore*, con actividad leishmanicida frente a promastigotes y amastigotes de *L. major* y *L. donovani*. Además, se evidenciaron daños ultraestructurales a nivel de la mitocondria, sugiriendo alteraciones en el metabolismo energético del parásito (Chen et al. 1993). Más tarde se ha determinado que la licochalcona A actúa inhibiendo específicamente la actividad enzimática de la fumarato reductasa, enzima propia de *Leishmania* (Chen et al. 2001). También determinaron la eficacia en modelos *in vivo*, en ratones BALB/c infectados con *L. major*, observándose que se inhibía significativamente el progreso de la lesión y, en cricetos infectados con *L. donovani*, la carga parasitaria en hígado y bazo, se reducía en más del 95% (Chen et al. 1994).

Entre otros metabolitos identificados con actividad leishmanicida se encuentra la 2',6'-Dihidroxi-4'-metoxi chalcona aislada de *Piper aduncum*, de la flora brasileña, con actividad frente a *L. amazonensis* en el modelo *in vitro* e *in vivo* (Torres-Santos et al. 1999a; Torres-Santos et al. 1999c). También presentaron actividad leishmanicida los metabolitos aislados de *Psoralea polydenius*, la 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetil chalcona y la 2,2',4'-Trihidroxi-6'-metoxi-

3',5'-dimetil chalcona frente a *L. donovani*, la dalrubona y el eriodictiol frente a *L. mexicana* (Salem & Werbovetz 2005).

De la flora boliviana, se ha descrito la chalcona flavokavain, aislada de *Piper rusbyi*, con actividad frente a *L. amazonensis* en un modelo *in vivo* (Flores et al. 2007). De la flora peruana, se ha descrito la 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-dihidro-chalcona y 2',6',4-trihidroxi-4'-metoxi-dihidro-chalcona, aisladas de *Piper elongatum*, con actividad leishmanicida frente a promastigotes de *L. braziliensis*, *L. tropica* y *L. infantum* (Hermoso et al. 2003). Estos antecedentes, que evidencian las propiedades leishmanicidas de las chalconas, han llevado a diferentes grupos de investigación a sintetizar sustituyentes derivados de la estructura básica de la chalcona con el objetivo de identificar nuevos antiparasitarios frente a *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Plasmodium* (Nielsen et al. 1998; Lunardi et al. 2003; Barbosa et al. 2011; de Mello et al. 2013; Roussaki et al. 2013).

Las flavononas aisladas de *P. delineatum*, fueron menos activas en comparación con las chalconas y el fármaco de referencia miltefosina. Los compuestos pdP16, pdP10 y pdP20 presentaron similar actividad leishmanicida frente a los promastigotes de las 4 especies de *Leishmania*. De las que, solamente destacaremos la actividad de pdP20 (alpinetin), con IC₅₀ entre 19,4 – 25,3 µg/mL, por no mostrar toxicidad celular a las concentraciones evaluadas (<100 µg/mL). Por otra parte, las flavononas pdP28 (5,7-dimetoxi-8-hidroxi-flavanona) y pdP29 ((-)-(2S)-8-hidroxi-5,7,3'-trimetoxi-flavanona), aunque no presentaron toxicidad celular, fueron débilmente activas frente a todas las especies de *Leishmania*. Considerando estas diferencias, en la revisión bibliográfica se recoge que este compuesto (alpinetin) fue aislado inicialmente de *Alpinia katsumadai* Hayata y, entre sus propiedades biológicas, se ha descrito que posee actividad antiinflamatoria en modelos *in vivo*. Su mecanismo de acción podría ser a tres niveles: inhibiendo la infiltración de neutrófilos, activando la mieloperoxidasa, y

regulando los niveles de citoquinas proinflamatorias (Chen et al. 2013; Hu et al. 2013).

También se han evaluado 2 amidas aisladas de *P. delineatum*, la pdP22 (houttuynamida A) y la pdP13 (*N*-cinamoil-tiramina), siendo la actividad leishmanicida nula y escasa respectivamente. No se han descrito propiedades antiparasitarias de ninguno de los 2 compuestos. Sin embargo, la houttuynamida A presenta actividad antiviral frente al virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) (Chou et al. 2009), en cambio la *N*-cinamoil-tiramina, está descrita como un agente débilmente inhibidor de la ciclooxigenasa COX-I y COX-II (Park 2007).

Piper pseudoarboreum

La comparación de la actividad leishmanicida entre los distintos extractos, ha significado una moderada actividad del extracto etanólico que se incrementa en la fracción diclorometano y se potencia en la subfracción diclorometano pp6. De esta última subfracción se aislaron metabolitos derivados de amidas. De las 14 amidas evaluadas, se puede destacar la actividad leishmanicida de la ppP12 ((*E*)-piplartina), ppP13 ((*Z*)-piplartina) y ppP14 (piplaroxido), con IC₅₀ menor a 1,7 µg/mL, frente a promastigotes de las cuatro especies de *Leishmania* y en amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* un IC₅₀ de 2,57 y 2,6 µg/mL, para ppP12 y ppP13 respectivamente.

En la bibliografía está descrita la actividad leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de la piplartina de *Piper refractarum*, con un IC₅₀ de 7,5 µM (2,38 µg/mL), frente a promastigotes de *L. donovani* y que además muestra un 36% de reducción en el índice de parasitación del bazo de cricetos infectados con *L. donovani*, después del tratamiento con 10 dosis a 30 mg/Kg cada 5 días. En el modelo *in vitro*, la piplartina fue letal para adultos de *Schistosoma mansoni* y de la *schistosomula* pulmonar a 7 y 3 horas de incubación (LC₅₀ 7,87; 11,02 y 70,57 µM respectivamente) (de Moraes et al. 2013). Otros estudios determinaron que la piplartina, aislada de los callos de *Piper tuberculatum*, posee actividad

antifúngica e insecticida (Navickiene et al. 2003). Asimismo, ha mostrado actividad antitumoral inhibiendo la proliferación del antígeno Ki67 que está asociado a las fases del ciclo celular G1, S, G2 y M de las células tumorales, en ratones Swiss trasplantados con el tumor del sarcoma 180 (Bezerra et al. 2006).

Las amidas constituyen otro interesante grupo de compuestos en la terapia de la leishmaniosis, de ellas la más estudiada es la piperina, aislada de *Piper nigrum*. Su actividad leishmanicida *in vitro* frente a promastigotes de *L. donovani* fue descrita en 1993 (Kapil 1993). Más tarde, otros autores evaluaron su eficacia *in vivo*, tanto libre como formulada en liposomas, obteniendo una tasa de reducción del 29% y 77% en el bazo de cricetos infectados con *L. donovani*; además sugirieron que podría actuar inhibiendo la enzima ADN topoisomerasa tipo-I y también determinaron que no presentaba toxicidad alguna cuando se administran en cuatro dosis de 12,5 mg/Kg durante 18 días (Raay et al. 1999). Recientemente informaron que la piperina y la fenilamina presentan actividad frente a *L. amazonensis*, en formas promastigotes (IC₅₀ 14,2 y 28,9 μ M respectivamente) y amastigotes intracelulares (IC₅₀ 28 y 24,5 μ M respectivamente). Además, sugieren que el mecanismo de acción podría alterar el ciclo celular del parásito, causar daños a nivel de la membrana mitocondrial con pérdida del kinetoplasto e inhibir la síntesis o enzimas del metabolismo lipídico. (Ferreira et al. 2011).

Entre otras propiedades, varios estudios han mostrado que la piperina posee actividad antiinflamatoria: supresión de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), inducción de la adhesión del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) al neutrófilo, inhibición de la activación del factor nuclear kappa-beta (NF- κ B), TNF- α y la producción de óxido nítrico en modelos *in vitro* e *in vivo* (Pradeep & Kuttan 2003, 2004; Kumar et al. 2007; Woo et al. 2007).

Piper divaricatum

Continuando con el cribado farmacológico frente a formas promastigotes de las cuatro especies de *Leishmania*, se ha evaluado la actividad leishmanicida de compuestos fenil propanoides, ácidos benzoicos, flavonoides y terpenos aislados de la fracción diclorometano y subfracción 21 de las hojas de esta planta. La mayoría de los compuestos evaluados mostraron actividad leishmanicida, pero también presentaron efectos citotóxicos, incluso a concentraciones inferiores a los de la actividad leishmanicida. Sin embargo, se pueden rescatar las fenil propanoides pvP24 (elemicina) y pvP25 (miristicina), cuyas propiedades leishmanicidas aún no habían sido descritas. Sin embargo, se sabe que, tanto la elemicina como la miristicina, aisladas de *Diplolophium buchanani* presentan propiedades antifúngicas frente a *Cladosporium cucumerinum* y larvicida frente a *Aedes aegypti* (Marston et al. 1995). Por otro lado, la miristicina también fue identificada en *Piper mullesua* y se ha descrito su actividad insecticida en *Spilarctia obliqua* (Srivastava et al. 2001). En cambio, la elemicina, aislada de los aceites esenciales de las flores de *Daucus carota* L., presenta propiedades antibacterianas frente a *Campylobacter jejuni* (Rossi et al. 2007).

Otros estudios describen que la miristicina presenta propiedades como antidepresivo, antioxidante y antiinflamatorio (Tisserand & Balacs 1994). También se evaluó la capacidad citotóxica de la miristicina, y se ha descrito que induce apoptosis en células humanas derivadas del neuroblastoma línea SK-N-SH (Lee et al. 2005). Más tarde se determinó que el mecanismo apoptótico en células AA8 y EM9 es dependiente de la activación de las caspasas, por lo que se constituye en un agente de potencial riesgo para la salud (Martins et al. 2011). En este sentido cabe comentar que, en aquellos metabolitos o compuestos que sean potencialmente activos frente a *Leishmania*, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, es necesaria la incorporación de ensayos genotóxicos, con el fin de determinar el margen de seguridad en la terapia de la enfermedad.

Por otra parte el flavonoide pvP29 (2',3, 4-trihidroxi-4',6'-dimetoxichalcona), que fue el metabolito más activo de los aislados de esta planta, también presentó efectos tóxicos, al igual que la mayoría de las chalconas aisladas de *Piper delineatum*. Sin embargo, podría considerarse en futuros experimentos debido a su índice de selectividad mayor a 4, que de alguna manera representa un margen de seguridad. Por otra parte, es necesario mencionar que anteriormente no se han descrito propiedades antiparasitarias de este flavonoide. No obstante, Jun y colaboradores sintetizaron este flavonoide en la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria de la tirosinasa siendo activo a concentraciones mayores de 400 μ M (Jun et al. 2007).

PRODUCTOS DE SÍNTESIS QUÍMICA

Sin lugar a duda, la síntesis química de compuestos derivados a partir de un farmacóforo o “principio activo”, están dirigidos a potenciar la actividad farmacológica sobre una determinada diana y constituyen una alternativa de alto rendimiento en la búsqueda de nuevas entidades terapéuticas. En este apartado, hemos centrado nuestro interés en compuestos derivados de sulfonamidas y de los alcaloides oxoisoaporfina.

Sulfonamidas

Las sulfonamidas se constituyen en un importante grupo de entidades químicas con diferentes aplicaciones farmacológicas en la terapia clínica, se le han atribuido propiedades diuréticas (Vullo et al. 2009), hipoglucemiantes (Selam 1997), antitiroideas (Thornber 1979), antiinflamatorias (Bano et al. 2011) y entre las patologías de origen infeccioso son ampliamente conocidos como antibacterianos (Drews 2000), antifúngicos (Chohan 2009), antivirales (Loh et al. 2010) y antiparasitarios. Entre ellas podemos citar la potencial actividad en el control de las enfermedades tropicales como la malaria (Krungkrai et al. 2005), la enfermedad de Chagas (Kim et al. 2009; Galiana-Roselló et al. 2013) y la leishmaniosis (Peixoto & Beverley 1987; George et al. 2006b; Dea-Ayuela et al.

2009; Marra et al. 2012; Baquedano et al. 2014). No está demás el mencionar que recientemente se ha descrito su actividad antitumoral (Ghorab et al. 2011; Shoaib Ahmad Shah et al. 2013). El amplio espectro de acción de las sulfonamidas y la eficacia antiparasitaria, previamente demostrada, son antecedentes de sus potencialidades aplicaciones en la terapia de la leishmaniosis.

En la primera serie se han evaluado 30 derivados sulfonamidas e identificado 2 compuestos con actividad leishmanicida frente a las cuatro especies de *Leishmania*, la 1a (4-Nitro-N-pirimidin-2-il bencen-sulfonamida) y 2d (4-Cloro-N-5-metil-tiazol-2-il-bencen-sulfonamida), con un rango de variabilidad de la IC₅₀ de 46,4 – 76,4 y 1,5 – 33,2 µM, respectivamente. Además, hemos puesto especial interés en la actividad selectividad de la 1n (4-Nitro-N-pirazin-2-il-bencen-sulfonamida) frente a *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum* (IC₅₀ de 61,5, 84,2 y 66,2 µM respectivamente) porque, en un estudio previo, nuestro grupo evaluó la eficacia de las sulfonamidas 1a y 1n en un modelo *in vivo* de infección aguda por *L. infantum* en ratones BALB/c infectados, donde a 5mg/Kg/día durante 10 días consecutivos, estas sulfonamidas reducían más del 97% la tasa de parasitación en hígado y bazo, señalando al grupo nitrobenzeno de especial relevancia en la actividad leishmanicida (Dea-Ayuela et al. 2009).

A fin de elucidar el mecanismo de acción, analizamos los daños ultraestructurales en promastigotes de *L. infantum*, después del contacto con las sulfonamidas 1a, 1n y 2d, durante 48 horas. Se destaca la presencia de daños en el núcleo, el kinetoplasto y la mitocondria, sugiriendo que el mecanismo de acción de estos compuestos podría implicar daños genómicos y mitocondriales. Así, nuestro grupo evidenció que las sulfonamidas 1a 1n y 2a presentaban actividad nucleasa en presencia de Cobre (II) y de ascorbato, probablemente por la formación de reactivos secundarios del oxígeno (Bilbao-Ramos et al. 2012). En correlación con estos resultados, otros autores también determinaron que las sulfonamidas tienen actividad nucleasa cuando se mezclan en complejos de

cobre (II) en presencia de ascorbato y peróxido de hidrogeno (Macías et al. 2003; Macías et al. 2007).

En la segunda serie se evaluó la actividad leishmanicida de 64 nuevos derivados de sulfonamidas e se identificaron 5 compuestos con potencial actividad. Estos se corresponden con la 6d (4-Fluoro-N-isoquinolin-5-il-bencen-sulfonamida), 8c (N-(2-metil-1H-indol-5-il)-bencen-sulfonamida), 9c (N-(1H-Indazol-5-il)-bencen-sulfonamida), 12c (N-benzotiazol-6-il-bencen-sulfonamida) y 14d (3-metil-1-(naftalen-1-sulfonyl)-piperidina), con rangos de actividad de IC₅₀ de 15,8 – 24,5; 15,4 – 28,9; 37,3 – 47,9; 18,4 – 82,7 µg/mL, sobre promastigotes y 23,0 – 42,9; 47,3 – 64,1; 30,8 – 83,2 y 39,2 – 77,5 µM, sobre amastigotes intracelulares respectivamente. A partir de esta selección primaria, se evaluó la eficacia de las sulfonamidas 6d, 8c, 9c, 12c y 14d, en el modelo de leishmaniosis visceral aguda en ratones BALB/c infectados con *L. infantum*. La sulfonamida 9c redujo más del 96% de la carga parasitaria en hígado y en bazo, a la dosis de 10 mg/Kg/día, durante 5 días consecutivos. En cambio la sulfonamida 14d solo fue activa en bazo con un 80% de reducción de la carga parasitaria, a la dosis de 5 mg/Kg/día, durante 5 días. El análisis por microscopia confocal de estas 2 sulfonamidas (Fig. 61), evidenció marcados daños a nivel de la β-tubulina. Además, la sulfonamida 14d parece alterar específicamente la estructura nuclear (Galiana-Roselló et al. 2013).

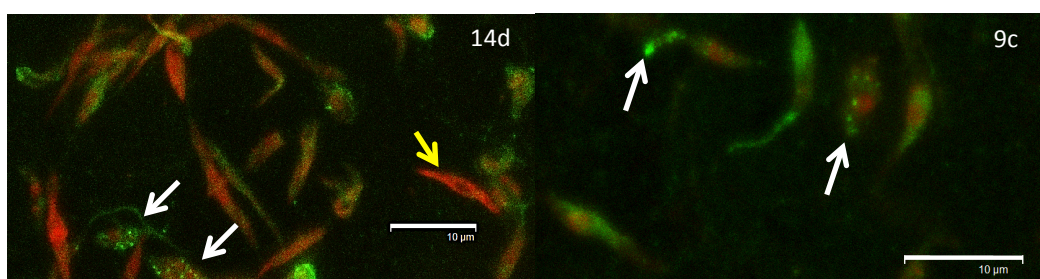


Fig. 61. Microscopía confocal de promastigotes de *L. infantum* marcados con la β-tubulina y ioduro de propidio. Alteraciones causadas a nivel del citoesqueleto (flechas blancas); Alteraciones a nivel del núcleo (flechas amarillas) (Galiana-Roselló et al. 2013).

Se ha sugerido que la tubulina podría ser una diana en la quimioterapia contra la leishmaniosis (Werbovetz et al. 1999). En tal sentido, Bhattacharya y colaboradores han descrito que diferentes derivados de las sulfonamidas, en especial la N1-fenil-3,5-dinitro-N4, N4-di-*n*-propilsulfonilamida (GB-II-5), presenta actividad leishmanicida y antitubulina (Bhattacharya et al. 2002; Werbovetz et al. 2003).

Oxoisoaporfinas

Las oxoisoaporfinas son alcaloides isoquinolínicos que inicialmente fueron aisladas de la planta trepadora *Menispermum dauricum* DC (*Menispermaceae*) y otras plantas de la misma familia con propiedades medicinales (Yu et al. 2001; Zhang et al. 2004). Existen pocos estudios sobre la actividad antiparasitaria. Entre ellos podemos citar los realizados con la O-metilmoschatolina y liriodenina, aislados a partir de *Annona foetida* (Annonaceae), con actividad leishmanicida frente a promastigotes de *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (Costa et al. 2006). Por otro lado, la actividad de las fracciones de alcaloides de plantas y arbustos provenientes de África como la *Stephania dinklagei*, ricas en oxoaporfinas como la dicentrinona y derivados como la N-metilliriodendronina, 2-O,N-diimetilliriodendronina y liriodenina, mostraban actividad leishmanicida frente a promastigotes de *L. donovani* (del Rayo Camacho et al. 2000).

En este sentido, se ha evaluado la actividad leishmanicida de 75 nuevos derivados de oxoisoaporfinas, resultado 13 activos frente a las 4 especies de *Leishmania* sin efectos citotóxicos. De ellos, hemos seleccionado los compuestos A4, A8, OXO1 y OXO13 para su valoración en amastigotes intracelulares. Siendo apreciable la actividad de los compuestos OXO-1 y A8 sobre *L. amazonensis* y el compuesto OXO-13 sobre *L. infantum*. De acuerdo a estos resultados, se evaluó la eficacia de las oxoisoaporfinas OXO1 y OXO13 en el modelo de leishmaniosis visceral aguda en ratones BALB/c infectados con *L. infantum*. La OXO1 redujo el 78% y 99% de la carga parasitaria en bazo e hígado respectivamente, a la dosis de 10 mg/Kg/día, durante 3 días consecutivos. En cambio, la OXO13 solamente

redujo el 10 y 38% de la carga parasitaria en bazo e hígado respectivamente, a la dosis de 10 mg/Kg/día, durante 3 días consecutivos. Además, los análisis bioinformáticos del proteoma de *Leishmania* sugieren que las dianas podrían ser 2 pteridina reductasas (1MXF y 1MXH), un N-miristoiltransferasa (2WUU) y una topoisomerasa de tipo-I (2B9S) (Sobarzo-Sánchez et al. 2013).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Como producto de los resultados obtenidos, podemos concluir que:

1. Mediante la secuenciación parcial del citocromo b, los aislados bolivianos de *Leishmania* se agruparon en 3 taxones claramente diferenciados, correspondientes a las especies de *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *lainsoni* y *Leishmania* (L.) *mexicana*. El análisis de las secuencias, junto con la reconstrucción de las relaciones filogenéticas, han permitido identificar polimorfismos intraespecíficos que dieron lugar a 3 haplotipos en *L. (V.) braziliensis*, 1 en *L. (V.) lainsoni*, y 2 en *L. (L.) mexicana*.
2. El análisis mediante la PCR-RFLP de la HSP70-I confirmó la agrupación en los complejos *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *L. (V.) lainsoni* y *L. (L.) mexicana*. Su combinación con los marcadores del citocromo b y la ITS-1 fue útil para identificar una nueva variedad que se agrupa dentro del complejo *Leishmania* (L.) *mexicana*.
3. Se confirma a *L. (V.) braziliensis* como el principal agente etiológico de la leishmaniosis en el Departamento de La Paz (Bolivia). En cambio, la distribución de *L. (L.) mexicana* se focaliza en la comunidad de Cajuata en la Provincia Inquisivi del mismo Departamento.
4. Tanto los métodos colorimétricos como fluorimétricos ensayados presentan un alto grado de sensibilidad y linealidad, por lo que son válidos para la cuantificación de promastigotes de *Leishmania*.
5. La simplicidad, reproducibilidad, estabilidad y bajo coste del método fluorimétrico de la resazurina, lo convierte en el sustrato de elección en la búsqueda de compuestos con potencial farmacológico.
6. El análisis de varianza determina que el método fluorimétrico con resazurina es equiparable al recuento microscópico de referencia, lo que valida su utilidad en el cribado farmacológico en promastigotes y amastigotes intracelulares de diferentes especies de *Leishmania*.

7. La marcada variabilidad inter e intra especie de los subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*, en la susceptibilidad a los fármacos convencionales, sientan las bases para la construcción de patrones que permitan identificar las causas del fracaso terapéutico detectado en el tratamiento de la leishmaniosis en Bolivia.
8. La anfotericina B en su estado poliagregado presenta mejor índice de selectividad que el resto de los estados de agregación, lo que puede constituir una alternativa más segura para el tratamiento de la leishmaniosis.
9. Entre los productos ensayados de *Piper spp.*, se han identificado 3 chalconas de *Piper delineatum* (pdP5, pdP23 y pdP24) y 2 amidas de *Piper pseudoarboreum* (ppP12 y ppP13) con potente actividad leishmanicida y favorable índice de selectividad.
10. Se han identificado 9 compuestos derivados de sulfonamidas (6e, 8c, 9c, 12c, 14d, 1a, 1n y 2d) con interesante actividad leishmanicida sin mostrar efectos tóxicos. El estudio mediante microscopía electrónica, sugiere que las dianas de los compuestos 1a, 1n y 2d se ubican en estructuras nucleares y mitocondriales del parásito.
11. Se presenta una novedosa serie de compuestos derivados de oxoisoaporfina, con actividad sobre promastigotes y amastigotes intracelulares de diferentes especies de *Leishmania*, destacándose OXO1, OXO13, A4 y A8 con un índice de selectividad superior al fármaco de referencia (miltefosina).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Adler - Moore J and Proffitt R. 2008. Amphotericin B lipid preparations: what are the differences? *Clinical Microbiology and Infection* 14: 25-36.

Aerdts S, Van Dalen R, Clasener H, Festen J, Van Lier H and Vollaard E. 1991. Antibiotic prophylaxis of respiratory tract infection in mechanically ventilated patients. A prospective, blinded, randomized trial of the effect of a novel regimen. *CHEST Journal* 100: 783-791.

Agrawal J, Shanker K, Chanda D and Pal A. 2013. *Nyctanthes arbor-tristis* positively affects immunopathology of malaria-infected mice prolonging its survival. *Parasitology Research*: 1-9.

Ajibade PA, Kolawole GA and O'Brien P. 2007. Metal Complexes of 4 - Amino - N - (2 - pyrimidinyl) benzene Sulfonamide: Synthesis, Characterization and Antiprotozoal Studies. Synthesis and Reactivity in Inorganic, *Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry* 37: 653-659.

Al-Abdely HM, Graybill JR, Loebenberg D and Melby PC. 1999. Efficacy of the Triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in Experimental Murine Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43: 2910-2914.

Alam MZ, Haralambous C, Kuhls K, Gouzelou E, Sgouras D, Soteriadou K, Schnur L, Pratlong F and Schönian G. 2009. The paraphyletic composition of *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 revealed by multilocus microsatellite typing. *Microbes and Infection* 11: 707-715.

Alexander J and Kaye P. 1985. Immunoregulatory pathways in murine leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clinical and experimental immunology* 61: 674.

Alexander J and Phillips RS. 1978. *Leishmania tropica* and *Leishmania mexicana*: cross-immunity in mice. *Experimental Parasitology* 45: 93-100.

Almeida LA and Araujo R. 2013. Highlights on molecular identification of closely related species. Infection, genetics and evolution : *journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 13: 67-75.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, et al. 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical microbiology reviews* 21: 334-359.

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M and Team WHOLC. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one* 7: e35671.

Alvar J, Yactayo S and Bern C. 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends in parasitology* 22: 552-557.

Alvar-Ezquerria J. 2001. Las Leishmaniasis: De la Biología al Control. Ed. *Laboratorios Intervet S. A.* 2ed. 2001

Andrighetti-Fröhner CR, de Oliveira KN, Gaspar-Silva D, et al. 2009. Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. *European journal of medicinal chemistry* 44: 755-763.

- Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng T-C, Najar E, Alvarez E, Matlashewski G and Alejandro L-C. 2001. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clinical infectious diseases* 33: 1847-1851.
- Arora S, Kapoor G and Sehgal S. 1998. Heterogeneity in heat shock protein genes in *Leishmania* isolates. *Immunology and cell biology* 76: 186-189.
- Asato Y, Oshiro M, Myint CK, et al. 2009. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Experimental Parasitology* 121: 352-361.
- Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP and Harris E. 1999. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *The Journal of parasitology* 85: 181-187.
- Avise JC. 1974. Systematic value of electrophoretic data. *Systematic Biology, Taylor & Francis Group* 23: 465-481.
- Azzouz S, Maache M, García RG and Osuna A. 2005. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 96: 60-65.
- Baginski M, Cybulska B and Gruszecki WI. 2006. Interaction of polyene macrolide antibiotics with lipid model membranes. *Advances in planar lipid bilayers and liposomes* 3: 269-329.
- Baiocco P, Colotti G, Franceschini S and Ilari A. 2009. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *Journal of medicinal chemistry* 52: 2603-2612.
- Balunas MJ, Linington RG, Tidgewell K, Fenner AM, Urena LD, Togna GD, Kyle DE and Gerwick WH. 2010. Dragonamide E, a modified linear lipopeptide from *Lyngbya majuscula* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products* 73: 60-66.
- Bano S, Javed K, Ahmad S, Rathish IG, Singh S and Alam MS. 2011. Synthesis and biological evaluation of some new 2-pyrazolines bearing benzene sulfonamide moiety as potential anti-inflammatory and anti-cancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46: 5763-5768.
- Bañuls AL, Hide M and Prugnolle F. 2007. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology* 64: 1-109.
- Bañuls AL, Hide M and Tibayrenc M. 1999. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *International journal for parasitology* 29: 1137-1147.
- Bañuls AL, Hide M and Tibayrenc M. 2002. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96 Suppl 1: S9-13.
- Baquedaño Y, Moreno E, Espuelas S, Nguewa P, Font M, Gutierrez KJ, Jiménez-Ruiz A, Palop JA and Sanmartín C. 2014. Novel hybrid selenosulfonamides as potent antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 74:116-23.
- Barbosa TP, Sousa SC, Amorim FM, Rodrigues YK, de Assis PA, Caldas JP, Oliveira MR and Vasconcellos ML. 2011. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. *Bioorganic Medical Chemistry* 19: 4250-4256.

- Barral A, Badaro R, Barral-Netto M, Grimaldi G, Jr., Momem H and Carvalho EM. 1986. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35: 732-734.
- Barral A, Petersen E, Sacks D and Neva F. 1983. Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32: 277.
- Basselin M, Denise H, Coombs GH and Barrett MP. 2002. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46: 3731-3738.
- Bates PA. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology* 37: 1097-1106.
- Bates PA and Tetley L. 1993. *Leishmania mexicana*: Induction of Metacyclogenesis by Cultivation of Promastigotes at Acidic pH. *Experimental Parasitology* 76: 412-423.
- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF and Jaffe CL. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology* 44: 1435-1439.
- Bent JP and Kuhn FA. 1996. Antifungal activity against allergic fungal sinusitis organisms. *The Laryngoscope* 106: 1331-1334.
- Berman J. 2005. Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert opinion on pharmacotherapy* 6: 1381-1388.
- Berman JD and Wyler DJ. 1980. An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *Journal of infectious diseases* 142: 83-86.
- Bermudez H, Rojas E, García L, Desjeux P, Dujardin J-C, Boelaert M and Chappuis F. 2006. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Annals of tropical medicine and parasitology* 100: 591-600.
- Bermudez L. 1993. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. *Clinical & Experimental Immunology* 91: 277-281.
- Bezerra DP, Castro FO, Alves AP, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Elmiro FJ and Costa-Lotufo LV. 2006. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* 39: 801-807.
- Bhandari V, Kulshrestha A, Deep DK, et al. 2012. Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases* 6: e1657.
- Bhat GJ, Koslowsky DJ, Feagin JE, Smiley BL and Stuart K. 1990. An extensively edited mitochondrial transcript in kinetoplastids encodes a protein homologous to ATPase subunit 6. *Cell* 61: 885-894.
- Bhattacharya G, Herman J, Delfin D, Salem MM, Barszcz T, Mollet M, Riccio G, Brun R and Werbovets KA. 2004. Synthesis and antitubulin activity of N 1-and N4-substituted 3, 5-dinitro

sulfanilamides against African Trypanosomes and *Leishmania*. *Journal of medicinal chemistry* 47: 1823-1832.

Bhattacharya G, Salem MM and Werbovetz KA. 2002. Antileishmanial dinitroaniline sulfonamides with activity against parasite tubulin. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 12: 2395-2398.

Bilbao-Ramos P, Galiana-Rosello C, Dea-Ayuela MA, Gonzalez-Alvarez M, Vega C, Rolon M, Perez-Serrano J, Bolas-Fernandez F and Gonzalez-Rosende ME. 2012. Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities. *Parasitology international* 61: 604-613.

Birdsall TC and Kelly GS. 1997. Berberine therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Alternative Medicine Review* 2.

Bodiwala HS, Singh G, Singh R, Dey CS, Sharma SS, Bhutani KK and Singh IP. 2007. Antileishmanial amides and lignans from Piper cubeba and Piper retrofractum. *Journal of Natural Medicines* 61: 418-421.

Bodley AL, McGarry MW and Shapiro TA. 1995. Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species. *Journal of infectious diseases* 172: 1157-1159.

Boite MC, Mauricio IL, Miles MA and Cupolillo E. 2012. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania* (*Viannia*) parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS neglected tropical diseases* 6: e1888.

Bolard J, Legrand P, Heitz F and Cybulska B. 1991. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry* 30: 5707-5715.

Bonano VI, Yokoyama-Yasunaka JKU, Miguel DC, Jones SA, Dodge JA and Uliana SRB. 2013. Discovery of Synthetic *Leishmania* Inhibitors by Screening of a 2-Arylbenzothiophene Library. *Chemical Biology & Drug Design* 83: 289-296.

Bourdy G, DeWalt S, Chávez de Michel L, Roca A, Deharo E, Muñoz V, Balderrama L, Quenevo C and Gimenez A. 2000. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. *Journal of ethnopharmacology* 70: 87-109.

Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL, de O Matos M, Moreira FO, Scio E and Coimbra ES. 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of ethnopharmacology* 111: 396-402.

Brajtburg J, Elberg S, Medoff J, Kobayashi G, Schlessinger D and Medoff G. 1984. Stimulatory, permeabilizing, and toxic effects of amphotericin B on L cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 26: 892-897.

Brajtburg J, Powderly W, Kobayashi G and Medoff G. 1990. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 34: 183-188.

Brandau S, Dresel A and Clos J. 1995. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *The Biochemical journal* 310 (Pt 1): 225-232.

Bray PG, Barrett MP, Ward SA and de Koning HP. 2003. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in parasitology* 19: 232-239.

- Bringmann G, Hamm A, Günther C, Michel M, Brun R and Mudogo V. 2000. Ancistrocalones A and B, Two New Bioactive Naphthylisoquinolines, and Related Naphthoic Acids from *Ancistrocladus ealaensis* 1. *Journal of natural products* 63: 1465-1470.
- Brundtland GH. 2002. From the World Health Organization. Reducing risks to health, promoting healthy life. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 288: 1974.
- Brutyan RA and McPhie P. 1996. On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes. *The Journal of General Physiology* 107: 69-78.
- Buckner FS and Wilson AJ. 2005. Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania* amastigotes grown in macrophages. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 600-605.
- Buitrago R, Cupolillo E, Bastrenta B, Le Pont F, Martinez E, Barnabé C and Brenière SF. 2011. PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 557-563.
- Cabrera-Serra MG, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B and Pinero JE. 2007. *In vitro* activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. *Parasitology Research* 100: 1155-1157.
- Calla - Magariños J, Quispe T, Giménez A, Freysdottir J, Troye - Blomberg M and Fernández C. 2013. Quinolinic Alkaloids from *Galipea longiflora* Krause Suppress Production of Proinflammatory Cytokines in vitro and Control Inflammation in vivo upon *Leishmania* Infection in Mice. *Scandinavian journal of immunology* 77: 30-38.
- Calvo-Álvarez E, Guerrero NA, Álvarez-Velilla R, et al. 2012. Appraisal of a *Leishmania major* Strain Stably Expressing mCherry Fluorescent Protein for Both *In Vitro* and *In Vivo* Studies of Potential Drugs and Vaccine against Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases* 6: e1927.
- Carrio J, Riera C, Gallego M and Portus M. 2001. In vitro activity of pentavalent antimony derivatives on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum* strains from humans and dogs in Spain. *Acta tropica* 79: 179-183.
- Carter KC, Hutchison S, Boitelle A, Murray HW, Sundar S and Mullen AB. 2005. Sodium stibogluconate resistance in *Leishmania donovani* correlates with greater tolerance to macrophage antileishmanial responses and trivalent antimony therapy. *Parasitology* 131: 747-757.
- Carter KC, Hutchison S, Henriquez FL, Legare D, Ouellette M, Roberts CW and Mullen AB. 2006. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50: 88-95.
- Cavalier-Smith T. 1978. The evolutionary origin and phylogeny of microtubules, mitotic spindles and eukaryote flagella. *Bio Systems* 10: 93-114.
- Cavalier-Smith T. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews* 57: 953-994.
- Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 73: 203-266.

Cavalier-Smith T. 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52: 297-354.

Cavalier-Smith T and Chao EE. 2003. Phylogeny and classification of phylum *Cercozoa* (Protozoa). *Protist* 154: 341-358.

Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R and Deplazes P. 1999. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Journal of veterinary internal medicine/American College of Veterinary Internal Medicine* 13: 330-334.

Chan-Bacab MJ and Peña-Rodriguez LM. 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural product reports* 18: 674-688.

Chen H, Mo X, Yu J and Huang Z. 2013. Alpinetin attenuates inflammatory responses by interfering toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *International immunopharmacology* 17: 26-32.

Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, Theander TG and Kharazmi A. 1993. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37: 2550-2556.

Chen M, Christensen SB, Theander TG and Kharazmi A. 1994. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 38: 1339-1344.

Chen M, Zhai L, Christensen SB, Theander TG and Kharazmi A. 2001. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by Chalcones. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45: 2023-2029.

Cheron M, Petit C, Bolard J and Gaboriau F. 2003. Heat-induced reformulation of amphotericin B-deoxycholate favours drug uptake by the macrophage-like cell line J774. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 52: 904-910.

Chibale K, Haupt H, Kendrick H, Yardley V, Saravanamuthu A, Fairlamb AH and Croft SL. 2001. Antiprotozoal and cytotoxicity evaluation of sulfonamide and urea analogues of quinacrine. *Bioorganic Medical Chemistry Lett* 11: 2655-2657.

Chohan ZH. 2009. Metal-based antibacterial and antifungal sulfonamides: synthesis, characterization, and biological properties. *Transition metal chemistry* 34: 153-161.

Chou S-C, Su C-R, Ku Y-C and Wu T-S. 2009. The constituents and their bioactivities of Houttuynia cordata. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57: 1227-1230.

Choudhary D and Kale RK. 2002. Antioxidant and non - toxic properties of Piper betle leaf extract: in vitro and in vivo studies. *Phytotherapy research* 16: 461-466.

Chowdhury S, Mukherjee T, Mukhopadhyay R, Mukherjee B, Sengupta S, Chattopadhyay S, Jaisankar P, Roy S and Majumder HK. 2012. The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. *EMBO molecular medicine* 4: 1126-1143.

Clark JM, Whitney RR, Olsen SJ, George RJ, Swerdel MR, Kunselman L and Bonner DP. 1991. Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 35: 615-621.

- Claudino VD, Silva KCd, Cechinel Filho V, Yunes RA, Monache FD, Giménez A, Salamanca E, Gutierrez-Yapu D and Malheiros A. 2013. Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108: 140-144.
- Cohen J, Opal SM and Powderly WG. 2010. Infectious Diseases: *Elsevier Science Health Science Division*.
- Conway DJ, Fanello C, Lloyd JM, et al. 2000. Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Molecular and biochemical parasitology* 111: 163-171.
- Cook G. 2007. Tropical Medicine: *An Illustrated History of The Pioneers: Elsevier Science*.
- Cook GC and Zumla A. 2008. Manson's tropical diseases: *Elsevier Health Sciences*.
- Corral MJ, González E, Cuquerella M and Alunda JM. 2013. Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. *Journal of Microbiological Methods* 94: 111-116.
- Costa EV, Pinheiro MLB, Xavier CM, et al. 2006. A Pyrimidine- β -carboline and Other Alkaloids from *Annona foetida* with Antileishmanial Activity. *Journal of Natural Products* 69: 292-294.
- Cox FE. 2002. History of human parasitology. *Clinical microbiology reviews* 15: 595-612.
- Coy Barrera CA, Coy Barrera ED, Granados Falla DS, Delgado Murcia G and Cuca Suarez LE. 2011. Seco-limonoids and quinoline alkaloids from *Raputia heptaphylla* and their antileishmanial activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 59: 855-859.
- Croft SL and Coombs GH. 2003. Leishmaniasis: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in parasitology* 19: 502-508.
- Croft SL and Engel J. 2006. Miltefosine: discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100 (1): S4-8.
- Croft SL, Yardley V and Kendrick H. 2002. Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96 (1): S127-S129.
- Cruz CF, Cruz MF and Galati EA. 2013. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 108.
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P and Alvar J. 2006. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *The Indian journal of medical research* 123: 357-388.
- Cuba Cuba C. 2000. Diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria americana. Salud Publica Perú. *Revista Medicina Experimental* 17: 39-52.
- Cunningham ML and Fairlamb AH. 1995. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *European journal of biochemistry. FEBS* 230: 460-468.
- Cyrino LT, Araújo AP, Joazeiro PP, Vicente CP and Giorgio S. 2012. *In vivo* and *in vitro* *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. *Tissue and Cell* 44: 401-408.
- Czekanska EM. 2011. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. Mammalian Cell Viability. *Springer. Methods in molecular Biology* 740: 27-32.

- da Luz RI, Vermeersch M, Dujardin J-C, Cos P and Maes L. 2009. *In vitro* sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53: 5197-5203.
- da Silva ER, Maquiaveli CdC and Magalhães PP. 2012. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Experimental Parasitology* 130: 183-188.
- da Silva Filho AA, Costa ES, Cunha WR, Silva ML, Nanayakkara N and Bastos JK. 2008. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytotherapy research* 22: 1307-1310.
- Das VN, Siddiqui NA, Pandey K, et al. 2009. A controlled, randomized nonblinded clinical trial to assess the efficacy of amphotericin B deoxycholate as compared to pentamidine for the treatment of antimony unresponsive visceral leishmaniasis cases in Bihar, India. *Therapeutics and clinical risk management* 5: 117-124.
- Dávila A and Momen H. 2000. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Annals of tropical medicine and parasitology* 94: 651-654.
- de Bruijn MH and Barker DC. 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta tropica* 52: 45-58.
- de Mello TF, Bitencourt HR, Pedrosa RB, Aristides SM, Lonardoni MV and Silveira TG. 2013. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Experimental Parasitology* 136C: 27-34.
- de Moraes J, Keiser J, Ingram K, et al. 2013. *In vitro* synergistic interaction between amide pipartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. *Current Medical Chemistry* 20: 301-309.
- Dea-Ayuela MA, Castillo E, Gonzalez-Alvarez M, Vega C, Rolon M, Bolas-Fernandez F, Borrás J and Gonzalez-Rosende ME. 2009. *In vivo* and *in vitro* anti-leishmanial activities of 4-nitro-N-pyrimidin- and N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and N2-(4-nitrophenyl)-N1-propylglycinamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 7449-7456.
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iniguez S and Bolas-Fernandez F. 2006. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics* 6: 4187-4194.
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iniguez S, Sanchez-Brunete JA, Torrado JJ, Alunda JM and Bolas-Fernandez F. 2004. Anti-leishmanial activity of a new formulation of amphotericin B. *Tropical medicine & international health* 9: 981-990.
- Decuypere S, Vanaerschot M, Bruncker K, Imamura H, Muller S, Khanal B, Rijal S, Dujardin JC and Coombs GH. 2012. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. *PLoS neglected tropical diseases* 6: e1514.
- del Rayo Camacho M, Kirby GC, Warhurst DC, Croft SL and Phillipson JD. 2000. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. *Planta medica* 66: 478-480.

- Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, da Cunha Pinto Â, Henriques AT, Bou-Habib DC and Saraiva EM. 2001. Antileishmanial Activity of an Indole Alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45: 1349-1354.
- Demicheli C, Ochoa R, da Silva JB, Falcão CA, Rossi-Bergmann B, de Melo AL, Sinisterra RD and Frézard F. 2004. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 100-103.
- Denton H, McGregor JC and Coombs GH. 2004. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *The Biochemical journal* 381: 405-412.
- Desjeux P. 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in dermatology* 14: 417-423.
- Desjeux P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 239-243.
- Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 27: 305-318.
- Desjeux P, Mollinedo S, Le Pont F, Paredes A and Ugarte G. 1987. Cutaneous leishmaniasis in Bolivia. A study of 185 human cases from Alto Beni (La Paz Department). Isolation and isoenzyme characterization of 26 strains of *Leishmania brasiliensis brasiliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 742-746.
- Dey T, Afrin F, Anam K and Ali N. 2002. Infectivity and Virulence of *Leishmania donovani* Promastigotes a Role for Media, Source, and Strain of Parasite. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 270-274.
- Di Giorgio C, Delmas F, Akhmedjanova V, Ollivier E, Bessonova I, Riad E and Timon-David P. 2005. *In vitro* antileishmanial activity of diphyllin isolated from *Haplophyllum bucharicum*. *Planta medica* 71: 366-369.
- Dockrell D and Kinghorn G. 2001. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 751-755.
- Domínguez XA and Alcorn JB. 1985. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of Northeastern Mexico. *Journal of ethnopharmacology* 13: 139-156.
- Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH and de Vries PJ. 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67: 2576-2597.
- Downey AS, Graczyk TK and Sullivan DJ. 2009. *In vitro* activity of pyrvinium pamoate against *Entamoeba histolytica* and *Giardia intestinalis* using radiolabelled thymidine incorporation and an SYBR Green I-based fluorescence assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64: 751-754.
- Downing T, Imamura H, Decuyper S, et al. 2011. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome research* 21: 2143-2156.
- Drews J. 2000. Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287: 1960-1964.

- Duenas-Romero AM, Loiseau PM and Saint-Pierre-Chazalet M. 2007. Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochimica et biophysica acta* 1768: 246-252.
- Dutcher JD. 1968. The discovery and development of amphotericin B. *Chest Journal* 54: 296-298.
- Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C and Chatterjee M. 2005. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology international* 54: 119-122.
- Dutta AK. 2008. Pursuit of medical knowledge: Charles Donovan (1863-1951) on kala-azar in India. *Journal of medical biography* 16: 72-76.
- Efron B, Halloran E and Holmes S. 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 13429-13429.
- Ekoue-Kovi K, Yearick K, Iwaniuk DP, Natarajan JK, Alumasa J, de Dios AC, Roepe PD and Wolf C. 2009. Synthesis and antimalarial activity of new 4-amino-7-chloroquinolyl amides, sulfonamides, ureas and thioureas. *Bioorganic & Medical Chemistry* 17: 270-283.
- el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W and Schonian G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94: 575-579.
- Engwerda CR, Murphy ML, Cotterell SE, Smelt SC and Kaye PM. 1998. Neutralization of IL - 12 demonstrates the existence of discrete organ - specific phases in the control of *Leishmania donovani*. *European Journal of Immunology* 28: 669-680.
- Escalante AA, Freeland DE, Collins WE and Lal AA. 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 8124 - 8129.
- Escobar P, Matu S, Marques C and Croft SL. 2002. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta tropica* 81: 151-157.
- Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP and Torrado JJ. 2008a. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International Journal of Pharmaceutic* 361: 64-69.
- Espada R, Valdespina S, Dea MA, Molero G, Ballesteros MP, Bolas F and Torrado JJ. 2008b. *In vivo* distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 61: 1125-1131.
- Esposti MD, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T and Meyer A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et biophysica acta* 1143: 243-271.
- Everson da Silva L, Teixeira de Sousa Jr P, Nunes Maciel E, Korting Nunes R, Eger I, Steindel M and Andrade Rebelo R. 2010. *In vitro* antiprotozoal evaluation of zinc and copper complexes based on sulfonamides containing 8-aminoquinoline ligands. *Letters in Drug Design & Discovery* 7: 679-685.

- Faghihi G and Tavakoli - kia R. 2003. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate. *Clinical and experimental dermatology* 28: 13-16.
- Fathalla O, Haiba M and Maghraby A. 2003. Synthesis of New Uracil-5-Sulfonamide Derivatives and Immuno-Stimulatory Effect of a Chemically Modified Hemolymph of *Biomphalaria alexandrina* on *Schistosoma mansoni* Infected Mice. *Archives of pharmacal research* 26: 358-366.
- Felipe DF, Dias Filho BP, Nakamura CV and Cortez DA. 2008. Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Latin American Journal of Pharmacy* 27: 618-620.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*: 783-791.
- Fernández MM, Malchiodi EL and Algranati ID. 2011. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55: 86-93.
- Fernandez O, Diaz-Toro Y, Valderrama L, Ovalle C, Valderrama M, Castillo H, Perez M and Saravia NG. 2012. Novel approach to in vitro drug susceptibility assessment of clinical strains of *Leishmania* spp. *Journal of clinical microbiology* 50: 2207-2211.
- Ferreira C, Soares DC, Barreto-Junior CB, et al. 2011. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry* 72: 2155-2164.
- Ferreira dos S, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M and Frezard F. 2003. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 16: 441-446.
- Ferreira M, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Inchausti A, Nakayama H, Thouvenel C, Hocquemiller R and Fournet A. 2002. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. *Journal of ethnopharmacology* 80: 199-202.
- Filippin FB and Souza LC. 2006. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 42.
- Fitzgerald PR. 1975. New coccidia from the spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*) and great sculpin (*Myoxocephalus polyacanthocephalus*). *Journal of the Fisheries Board of Canada* 32: 649-651.
- Flores N, Cabrera G, Jimenez IA, Pinero J, Gimenez A, Bourdy G, Cortes-Selva F and Bazzocchi IL. 2007. Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. *Planta Medica* 73: 206-211.
- Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G and Bazzocchi IL. 2008. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. *Journal of Natural Products* 71: 1538-1543.
- Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G and Bazzocchi IL. 2009. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry* 70: 621-627.

- Florestais P. 2004. Genetic diversity of "Pimenta Longa" genotypes (Piper spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. *Genetics and Molecular Biology* 27: 74-82.
- Folgueira C and Requena JM. 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS microbiology reviews* 31: 359-377.
- Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, Pratlong F, Costa J-M and Bretagne S. 2007. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome B gene. *Journal of clinical microbiology* 45: 2110-2115.
- Fournet A, Barrios AA, Munoz V, Hocquemiller R and Cave A. 1992. Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)* 43: 219.
- Fournet A, Barrios AA, Munoz V, Hocquemiller R, Cave A and Bruneton J. 1993. 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37: 859-863.
- Fournet A, Barrios AA, Muñoz V, Hocquemiller R, Roblot F, Cavé A, Richomme P and Bruneton J. 1994. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy research* 8: 174-178.
- Fournet A, Ferreira ME, De Arias AR, De Ortiz ST, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A and Hocquemiller R. 1996. *In vivo* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40: 2447-2451.
- Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C and Van der Auwera G. 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 238-245.
- Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin JC and Requena JM. 2013. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 18: 229-237.
- Frankenburg S, Glick D, Klaus S and Barenholz Y. 1998. Efficacious topical treatment for murine cutaneous leishmaniasis with ethanolic formulations of amphotericin B. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42: 3092-3096.
- Frézard F, Demicheli C, Schettini D, Ribeiro R, Melo M and Michalick M. 2004. Processo para a preparação de formulações farmacêuticas do antimoniatto de meglumina em lipossomas e uso das formulações farmacêuticas em animais acometidos com leishmaniose visceral. *Brazil Patent Pending PI0405489*.
- Frézard F, Michalick M, Soares C and Demicheli C. 2000. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 841-846.
- Furtado TA, Cisalpino EO and Santos UM. 1960. *In vitro* studies of the effect of amphotericin B on *Leishmania brasiliensis*. *Antibiotics and chemotherapy* 10: 692-693.

- Galiana-Roselló C, Bilbao-Ramos P, Dea-Ayuela MA, et al. 2013. *In Vitro and in Vivo* Antileishmanial and Trypanocidal Studies of New N-Benzene- and N-Naphthalenesulfonamide Derivatives. *Journal of medicinal chemistry* 56: 8984-8998.
- Gallis HA, Drew RH and Pickard WW. 1990. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Reviews of infectious diseases* 12: 308-329.
- Ganfou H, Bero J, Tchinda AT, Gbaguidi F, Gbenou J, Moudachirou M, Frédérick M and Quetin-Leclercq J. 2012. Antiparasitic activities of two sesquiterpenic lactones isolated from *Acanthospermum hispidum* D.C. *Journal of ethnopharmacology* 141: 411-417.
- Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A and Chatterjee M. 2006. Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *Journal of Microbiological Methods* 66: 79-86.
- García AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H and Dujardin J-C. 2007a. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101: 368-371.
- García AL, Parrado R, Rojas E, Delgado R, Dujardin J-C and Reithinger R. 2009. Leishmaniasis in Bolivia: comprehensive review and current status. *American Journal Tropical Medicinal and Hygiene* 80: 704-711.
- García AL, Tellez T, Parrado R, Rojas E, Bermudez H and Dujardin J-C. 2007b. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101: 1208-1213.
- García L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Tintaya KWQ and Dujardin J-C. 2004. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of clinical microbiology* 42: 2294-2297.
- Gardener P. 1977. Taxonomy of the genus *Leishmania*: a review of nomenclature and classification. *Tropical diseases bulletin* 74: 1069.
- Garnier T and Croft SL. 2002. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Current opinion in investigational drugs* 3: 538-544.
- Gebre-Hiwot A, Tadesse G, Croft S and Frommel D. 1992. An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. *Acta tropica* 51: 237-245.
- George SS, Bishop JV, Titus RG and Selitrennikoff CP. 2006a. Novel compounds active against *Leishmania major*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 474-479.
- George TG, Endeshaw MM, Morgan RE, et al. 2007. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 3, 5-substituted-N1-phenyl-N4, N4-di-n-butylsulfanilamides as antikinoplastid antimicrotubule agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15: 6071.
- George TG, Johnsamuel J, Delfín DA, et al. 2006b. Antikinoplastid antimitotic activity and metabolic stability of dinitroaniline sulfonamides and benzamides. *Bioorganic & medicinal chemistry* 14: 5699-5710.

- Gerbaud E, Tamion F, Girault C, Clabault K, Lepretre S, Leroy J and Bonmarchand G. 2003. Persistent acute tubular toxicity after switch from conventional amphotericin B to liposomal amphotericin B (Ambisome). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51: 473-475.
- Ghorab MM, Ragab FA, Heiba HI and El-Hazek RM. 2011. Anticancer and radio-sensitizing evaluation of some new thiazolopyrane and thiazolopyranopyrimidine derivatives bearing a sulfonamide moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46: 5120-5126.
- Giménez A, Avila J, Ruiz G, et al. 2005. Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora* Krause. *Revista Boliviana de Química* 22: 94-107.
- Glew RH, Saha AK, Das S and Remaley AT. 1988. Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiological reviews* 52: 412-432.
- Godinho JL, Simas-Rodrigues C, Silva R, Urmenyi TP, de Souza W and Rodrigues JC. 2012. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. *International journal of antimicrobial agents* 39: 326-331.
- Golenser J, Frankenburg S, Ehrenfreund T and Domb AJ. 1999. Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with amphotericin B-arabinogalactan water-soluble derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 2209-2214.
- Gomes R, Macedo A, Pena S and Melo M. 1995. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp Parasitol* 80: 681-687.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romao RP, Plácido-Pereira RM and Da-Cruz AM. 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771-779.
- Gontijo VS, Judice WA, Codonho B, et al. 2012. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 58: 613-623.
- Gonzalez P, Marin C, Rodriguez-Gonzalez I, Hitos AB, Rosales MJ, Reina M, Diaz JG, Gonzalez-Coloma A and Sanchez-Moreno M. 2005. *In vitro* activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. *International Journal Of Antimicrobial Agents* 25: 136-141.
- González-Díaz H, Prado-Prado F, Sobarzo-Sánchez E, et al. 2011. NL MIND-BEST: A web server for ligands and proteins discovery—Theoretic-experimental study of proteins of *Giardia lamblia* and new compounds active against *Plasmodium falciparum*. *Journal of theoretical biology* 276: 229-249.
- Gopinath VS, Pinjari J, Dere RT, et al. 2013. Design, synthesis and biological evaluation of 2-substituted quinolines as potential antileishmanial agents. *European journal of medicinal chemistry* 69: 527-536.
- Grabmeier-Pfistershammer K, Pöpl W, Brunner P, Rappersberger K and Rieger A. 2012. Clinical Challenges in the Management of *Leishmania*/HIV Coinfection in a Nonendemic Area: A Case Report. *Case reports in infectious diseases*.
- Gradoni L, Soteriadou K, Louzir H, et al. 2008. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 13: 1272-1276.

- Grogl M, Thomason TN and Franke ED. 1992. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 47: 117-126.
- Gruda I, Gauthier E, Elberg S, Brajtburg J and Medoff G. 1988. Effects of the detergent sucrose monolaurate on binding of amphotericin B to sterols and its toxicity for cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 154: 954-958.
- Guo LS, Fielding RM, Lasic DD, Hamilton RL and Mufson D. 1991. Novel antifungal drug delivery: stable amphotericin B-cholesteryl sulfate discs. *Int J Pharm* 75: 45-54.
- Gupta S. 2011. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *The indian journal of medical research* 133: 27-39.
- Gupta S, Sundar S and Goyal N. 2005. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49: 3776-3783.
- Hall T. 2007. BioEdit v7 <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>.
- Hamill RJ. 2013. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs* 73: 919-934.
- Handman E. 1990. Study of *Leishmania major*-infected macrophages by use of lipophosphoglycan-specific monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* 58: 2297-2302.
- Handman E. 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical microbiology reviews* 14: 229-243.
- Harwood RF, James MT and Herms WB. 1979. Entomology in human and animal health: *Macmillan*. 101-874-776.
- He J, Chipot C, Shao X and Cai W. 2013. Cyclodextrin-Mediated Recruitment and Delivery of Amphotericin B. *The Journal of Physical Chemistry C* 117: 11750-11756.
- Hendricks L and Wright N. 1979. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by *in vitro* cultivation of saline aspirates in Schneider's Drosophila Medium. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 28: 962.
- Henry RJ. 1943. The Mode of Action of Sulfonamides. *Bacteriological reviews* 7: 175-262.
- Hermoso A, Jiménez IA, Mamani ZA, Bazzocchi IL, Piñero JE, Ravelo AG and Valladares B. 2003. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* 11: 3975-3980.
- Herwaldt BL. 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.
- Hodgkinson VH, Soong L, Duboise SM and McMahon-Pratt D. 1996. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Experimental Parasitology* 83: 94-105.
- Hommel M, Jaffe CL, Travi B and Milon G. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of tropical medicine and parasitology* 89 (1): 55-73.

- Howard MK, Pharoah MM, Ashall F and Miles MA. 1991. Human urine stimulates growth of *Leishmania in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85: 477-479.
- Hu K, Yang Y, Tu Q, Luo Y and Ma R. 2013. Alpinetin inhibits LPS-induced inflammatory mediator response by activating PPAR-gamma in THP-1-derived macrophages. *European journal of pharmacology* 721: 96-102.
- Huson DH and Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution* 23: 254-267.
- Iovannisci DM and Ullman B. 1983. High efficiency plating method for *Leishmania* promastigotes in semidefined or completely-defined medium. *The Journal of parasitology*: 633-636.
- Ishikawa E, Silveira F, Magalhães A, Guerra Jr R, Melo M, Gomes R, Silveira T and Shaw J. 2002. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: S111-S121.
- Ivens AC, Lewis SM, Bagherzadeh A, Zhang L, Chan HM and Smith DF. 1998. A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome. *Genome research* 8: 135-145.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, et al. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-442.
- Jadhav MP, Bamba A, Shinde VM, et al. 2010. Liposomal amphotericin B (Fungisome) for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV/AIDS patients in India: a multicentric, randomized controlled trial. *Journal of postgraduate medicine* 56: 71-75.
- Jain SK, Sahu R, Walker LA and Tekwani BL. 2012. A Parasite Rescue and Transformation Assay for Antileishmanial Screening Against Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes in THP1 Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line. *Journal of visualized experiments: JoVE* 70: 4052.
- Jamjoom M, Ashford R, Bates P, Chance M, Kemp S, Watts P and Noyes H. 2004. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and "*L. archibaldi*" from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology* 129: 399-409.
- Jermiin LS, Graur D, Lowe RM and Crozier RH. 1994. Analysis of directional mutation pressure and nucleotide content in mitochondrial cytochrome b genes. *Journal of molecular evolution* 39: 160-173.
- Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP and Madhubala R. 2009. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and biochemical parasitology* 164: 111-117.
- Johnson JD, Denuil RA, Gerena L, Lopez-Sanchez M, Roncal NE and Waters NC. 2007. Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 1926-1933.
- Jun N, Hong G and Jun K. 2007. Synthesis and evaluation of 2',4',6'-trihydroxychalcones as a new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 15: 2396-2402.
- Kapil A. 1993. Piperine: a potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Planta medica* 59.

- Kato H, Watanabe J, Nieto IM, Korenaga M and Hashiguchi Y. 2011. *Leishmania* species identification using FTA card sampling directly from patients' cutaneous lesions in the state of Lara, Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105: 561-567.
- Kayser O, Kiderlen AF, Laatsch H and Croft SL. 2000. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta tropica* 77: 307-314.
- Kean BH, Mott KE and Russell AJ. 1978. Tropical medicine and parasitology: classic investigations. *Cornell University Press*. 71: 104-105.
- Khalil EA, Musa AM, Younis BM, Elfaki ME, Zijlstra EE and Elhassan AM. 2011. Blindness following visceral leishmaniasis: a neglected post-kala-azar complication. *Tropical doctor* 41: 139-140.
- Khanra S, Datta S, Mondal D, Saha P, Bandopadhyay SK, Roy S and Manna M. 2012. RFLPs of ITS, ITS1 and hsp70 amplicons and sequencing of ITS1 of recent clinical isolates of Kala-azar from India and Bangladesh confirms the association of *L. tropica* with the disease. *Acta tropica* 124: 229-234.
- Kiderlen AF and Kaye PM. 1990. A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *Journal of immunological methods* 127: 11-18.
- Killeen TJ, García EE and Beck SG. 1993. Guía de árboles de Bolivia. La Paz: Herbario Nacional de Bolivia. *Editorial del Instituto de Ecología press*
- Killick-Kendrick R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology* 17: 279-289.
- Kim DH, Chung HJ, Bleys J and Ghohestani RF. 2009. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *PLoS neglected tropical diseases* 3: e381.
- Kim JH, Ryu HW, Shim JH, Park KH and Withers SG. 2009. Development of New and Selective *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase Inhibitors from Sulfonamide Chalcones and Their Derivatives. *ChemBioChem* 10: 2475-2479.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16: 111-120.
- Kinsky SC. 1970. Antibiotic interaction with model membranes. *Annual review of pharmacology* 10: 119-142.
- Kirtikar K and Basu B. 1935. Indian Medicinal Plants. *Indian Medicinal Plants* 72.
- Klang V, Haberfeld S, Hartl A and Valenta C. 2012. Effect of γ -cyclodextrin on the *in vitro* skin permeation of a steroidal drug from nanoemulsions: Impact of experimental setup. *International Journal of Pharmaceutics* 423: 535-542.
- Klang V, Matsko N, Zimmermann A-M, Vojnikovic E and Valenta C. 2010. Enhancement of stability and skin permeation by sucrose stearate and cyclodextrins in progesterone nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 393: 153-161.

Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N and Papadopoulos O. 2001. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology* 98: 247-261.

Krungkrai J, Scozzafava A, Reungprapavut S, Krungkrai SR, Rattanajak R, Kamchonwongpaisan S and Supuran CT. 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of Plasmodium falciparum carbonic anhydrase with aromatic sulfonamides: towards antimalarials with a novel mechanism of action? *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 483-489.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, et al. 2011. Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS neglected tropical diseases* 5: e1155.

Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W and Schönián G. 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes and Infection* 9: 334-343.

Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W and Schonian G. 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and infection/Institut Pasteur* 7: 1224-1234.

Kumar D, Kulshrestha A, Singh R and Salotra P. 2009. *In vitro* susceptibility of field isolates of *Leishmania donovani* to miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53: 835-838.

Kumar S, Singhal V, Roshan R, Sharma A, Rembhotkar GW and Ghosh B. 2007. Piperine inhibits TNF- α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF- κ B and I κ B kinase activation. *European journal of pharmacology* 575: 177-186.

Lainson R. 2010. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *rev Pan-Amaz Saude* 1: 13-32.

Lainson R, Ready PD and Shaw JJ. 1979. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society London B Biological Science* 206: 307-318.

Lainson R and Shaw JJ. 1972. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *British medical bulletin* 28: 44-48.

Lainson R and Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. *London: Academic Press*.

Lamy-Freund MT, Ferreira VF and Schreier S. 1985. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. *The Journal of antibiotics* 38: 753-757.

Lang T, Goyard S, Lebastard M and Milon G. 2005. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote - harbouring macrophages and for quantitative real - time monitoring of parasitism features in living mice. *Cellular microbiology* 7: 383-392.

Lavaud C, Massiot G, Vasquez C, Moretti C, Sauvain M and Balderrama L. 1995. 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. *Phytochemistry* 40: 317-320.

- Layegh P, Rajabi O, Jafari MR, Emamgholi Tabar Malekshah P, Moghiman T, Ashraf H and Salari R. 2011. Efficacy of topical liposomal amphotericin B versus intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of parasitology research* 2011.
- Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J and Milon G. 1996. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *Journal of Immunology* 157: 4537-4545.
- Lee BK, Kim JH, Jung JW, Choi JW, Han ES, Lee SH, Ko KH and Ryu JH. 2005. Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Toxicology letters* 157: 49-56.
- Leelayoova S, Siripattanapipong S, Hitakarun A, Kato H, Tan-ariya P, Siriyasatien P, Osatakul S and Mungthin M. 2013. Multilocus characterization and phylogenetic analysis of *Leishmania siamensis* isolated from autochthonous visceral leishmaniasis cases, southern Thailand. *BioMedCentral microbiology* 13: 60.
- Legrand P, Romero EA, Cohen BE and Bolard J. 1992. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 36: 2518-2522.
- Lehrl S. 2004. Clinical efficacy of kava extract WS® 1490 in sleep disturbances associated with anxiety disorders: Results of a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Journal of Affective Disorders* 78: 101-110.
- Librado P and Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H and Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3 - (4, 5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2, 5 - diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry* 69: 581-593.
- Loh B, Vozzolo L, Mok BJ, Lee CC, Fitzmaurice RJ, Caddick S and Fassati A. 2010. Inhibition of HIV-1 replication by isoxazolidine and isoxazole sulfonamides. *Chemical Biology & Drug Design* 75: 461-474.
- Lotery AJ, Kerr JR and Page BA. 1994. Fungal keratitis caused by *Scopulariopsis brevicaulis*: successful treatment with topical amphotericin B and chloramphenicol without the need for surgical debridement. *British Journal of Ophthalmology* 78: 730.
- Loukaci A, Kayser O, Bindseil K-U, Siems K, Frevert J and Abreu PM. 2000. New Trichothecenes Isolated from *Holarrhena floribunda*. *Journal of natural products* 63: 52-56.
- Luis L, Ramirez A, Aguilar CM, Eresh S, Barker DC and Mendoza-Leon A. 1998. The genomic fingerprinting of the coding region of the beta-tubulin gene in *Leishmania* identification. *Acta tropica* 69: 193-204.
- Lukes J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R and Englund PT. 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell* 1: 495-502.
- Lumsden WH. 1977. Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale* 57: 361-368.
- Lunardi F, Guzela M, Rodrigues AT, et al. 2003. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47: 1449-1451.

- Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D and Oppendoes FR. 2000. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology* 111: 1-14.
- Luyo-Acero G, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, Gomez-Landires E, Hashiguchi Y and Nonaka S. 2004. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology* 128: 483-491.
- Ma C, Tran J, Gu F, Ochoa R, Li C, Sept D, Werbovetz K and Morrisette N. 2010. Dinitroaniline Activity in *Toxoplasma gondii* Expressing Wild-Type or Mutant α -Tubulin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54: 1453-1460.
- Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX and Robert-Gero M. 1997. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Experimental cell research* 232: 339-348.
- Machado PR, Ampuero J, Guimaraes LH, et al. 2010. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS neglected tropical diseases* 4: e912.
- Macías B, García I, Villa MaV, Borrás Jn, González-Álvarez M and Castiñeiras A. 2003. Structural characterisation and nuclease activity of mixed copper (II) complexes with sulfonamides and bipyridil. *Inorganica chimica acta* 353: 139-144.
- Macías B, Villa MV, Sánchez - Mesonero L, Sanz F, Borrás J and González - Álvarez M. 2007. Copper Complexes with Sulfonamides Derivatives of Natural Amino Acids as Chemical Nucleases. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* 633: 1937-1944.
- Maes L, Berghe DV, Germonprez N, Quirijnen L, Cos P, De Kimpe N and Van Puyvelde L. 2004. *In vitro* and *in vivo* activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 130-136.
- Magaraci F, Jimenez CJ, Rodrigues C, et al. 2003. Azasterols as Inhibitors of Sterol 24-Methyltransferase in *Leishmania* Species and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of medicinal chemistry* 46: 4714-4727.
- Mahiou V, Roblot F, Hocquemiller R, Cave A, Rojas de Arias A, Inchausti A, Yaluff G, Fournet A and Angelo A. 1994. New aporphine alkaloids from guatteria foliosa. *Journal of Natural Products* 57: 890-895.
- Maia C, Nunes M, Marques M, Henriques S, Rolao N and Campino L. 2013. *In vitro* drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. *Experimental Parasitology* 135: 36-41.
- Manson-Bahr PEC. 1996. OldWorld Leishmaniasis. United Kingdom: F.E.G. Cox. *The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases*.
- Marco JD, Uezato H, Mimori T, Barroso PA, Korenaga M, Nonaka S, Basombrío MA, Taranto NJ and Hashiguchi Y. 2006. Are cytochrome B gene sequencing and polymorphism-specific polymerase chain reaction as reliable as multilocus enzyme electrophoresis for identifying *Leishmania* spp. from Argentina?. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 75: 256-260.
- Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP and Felger I. 2003a. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the minixon

sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of clinical microbiology* 41: 3147-3153.

Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck H-P and Felger I. 2003b. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic Microbiology of Infection Diseases* 46: 115-124.

Marín C, Boutaleb-Charki S, Díaz JsG, Huertas O, Rosales MaJ, Pérez-Cordon G, Guitierrez-Sánchez R and Sánchez-Moreno M. 2009. Antileishmaniasis Activity of Flavonoids from *Consolida oliveriana*. *Journal of natural products* 72: 1069-1074.

Marra RK, Bernardino AM, Proux TA, et al. 2012. 4-(1H-Pyrazol-1-yl) Benzenesulfonamide Derivatives: Identifying New Active Antileishmanial Structures for Use against a Neglected Disease. *Molecules* 17: 12961-12973.

Marston A, Hostettmann K and Msonthi JD. 1995. Isolation of antifungal and larvicidal constituents of *Diplophium buchanani* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Natural Products* 58: 128-130.

Martín - Quintal Z, del Rosario García - Miss M, Mut - Martín M, Matus - Moo A, Torres - Tapia LW and Peraza - Sánchez SR. 2010. The leishmanicidal effect of (3S) - 16, 17 - dihydrofalcarinol, an oxylipin isolated from *Tridax procumbens*, is independent of NO production. *Phytotherapy research* 24: 1004-1008.

Martinez E, Le Pont F, Torrez M, Telleria J, Vargas F, Muñoz M, De Doncker S, Dujardin J and Dujardin J. 1998. A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazonensis* in a Sub Andean region of Bolivia. *Acta tropica* 71: 97-106.

Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls A-L and Le Pont F. 2002. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum*/*L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 529-532.

Martinez E, Pont FL, Mollinedo S and Cupolillo E. 2001. A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 375-377.

Martinez S, Looker DL and Marr JJ. 1988. A tissue culture system for the growth of several species of *Leishmania*: Growth kinetics and drug sensitivities. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 38: 304.

Martins C, Doran C, Laires A, Rueff J and Rodrigues AS. 2011. Genotoxic and apoptotic activities of the food flavourings myristicin and eugenol in AA8 and XRCC1 deficient EM9 cells. *Food and Chemical Toxicology* 49: 385-392.

Martins PS, Ochoa R, Pimenta A, Ferreira LA, Melo AL, da Silva JB, Sinisterra RD, Demicheli C and Frézard F. 2006. Mode of action of β -cyclodextrin as an absorption enhancer of the water-soluble drug meglumine antimoniate. *International Journal of Pharmaceutic* 325: 39-47.

Marzzullo L, Souza LC and Campa A. 1997. Effect of amphotericin B associated with a lipid emulsion on the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes. *General pharmacology* 28: 203-207.

Mauel J. 1987. Studies on intracellular killing of *Leishmania major* and lysis of host macrophages by immune lymphoid cells *in vitro*. *Parasite and Immunology* 9: 721-736.

- Mauel J, Buchmuller Y and Behin R. 1978. Studies on the mechanisms of macrophage activation. I. Destruction of intracellular *Leishmania enriettii* in macrophages activated by cocultivation with stimulated lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 148: 393-407.
- Mauricio I, Howard M, Stothard J and Miles M. 1999. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 119: 237-246.
- Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E, Dedet JP, Lukes J and Miles MA. 2006. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *International journal for parasitology* 36: 757-769.
- Mayer MP and Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences* 62: 670-684.
- Mazerski J and Borowski E. 1995. Molecular dynamics of amphotericin B I. Single molecule in vacuum and water. *Biophysical chemistry* 54: 49-60.
- Mazerski J and Borowski E. 1996. Molecular dynamics of amphotericin B. II. Dimer in water. *Biophysical chemistry* 57: 205-217.
- Mazerski J, Grzybowska J and Borowski E. 1990. Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. *European biophysics journal* : EBJ 18: 159-164.
- McCarthy C. 1998. Chromas 1.45. School of Health Science, Queensland, Australia. *Griffith University, Southport*,
- McCarthy-Burke C, Bates PA and Dwyer DM. 1991. *Leishmania donovani*: Use of two different, commercially available, chemically defined media for the continuous in vitro cultivation of promastigotes. *Experimental Parasitology* 73: 385-387.
- McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC and Teasdale RD. 2002. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 122-154.
- Mesa-Arango AC, Scorzoni L and Zaragoza O. 2012. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in microbiology* 3.
- Meyer A. 1994. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 278-280.
- Mikus J and Steverding D. 2000. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue®. *Parasitology international* 48: 265-269.
- Milkman R. 1973. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science* 182: 1024-1026.
- Mishra BB, Kale RR, Singh RK and Tiwari VK. 2009. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* 80: 81-90.
- Mitra A and Sept D. 2006. Binding and interaction of dinitroanilines with apicomplexan and kinetoplastid alpha-tubulin. *Journal of medicinal chemistry* 49: 5226-5231.
- Mitra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S and Majumder HK. 2000. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent

that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Molecular medicine-cambridge ma then new york- 6*: 527-541.

Mohamed-Ahmed AH, Brocchini S and Croft SL. 2012. Recent advances in development of amphotericin B formulations for the treatment of visceral leishmaniasis. *Current opinion in infectious diseases* 25: 695-702.

Mollinedo S. 2002. Manual práctico de tratamiento de las leishmaniasis. In: Unidad de Parasitología y Entomología. *INLASA La Paz*.

Mollinedo S, Monasterios H, Magne M, et al. 2007. Leishmaniasis: Guía Operativa para el Control en Bolivia. Unidad de Epidemiología, *Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis Comité de Identidad Institucional-Ministerio de Salud y Deportes*.

Molyneux DH and Killick-Kendrick R. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. *United Kingdom: Academic Press Inc*. 121-176.

Mondal S, Bhattacharya P, Rahaman M, Ali N and Goswami RP. 2010. A curative immune profile one week after treatment of Indian kala-azar patients predicts success with a short-course liposomal amphotericin B therapy. *PLoS neglected tropical diseases* 4: e764.

Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC and Van der Auwera G. 2010. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* 137: 1159-1168.

Montalvo AM, Sifontes S, Montano I and Espino AM. 2000. Necesidad del uso de cromógenos para cuantificar promastigotes de *Leishmania* en placas de 96 pozos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 52: 95-100.

Monte-Alegre A, Ouaisi A and Sereno D. 2006. *Leishmania* amastigotes as targets for drug screening. *Kinetoplastid biology and disease* 5: 6.

Monteiro MC, Marques FC, Blazius RD, Santos da Silva O, de Queiroz Cunha F, Bento DB and Torres Romao PR. 2008. N-acetyl-L-cysteine reduces the parasitism of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research* 102: 801-803.

Monzote L. 2009. Current treatment of leishmaniasis: a review. *Open Antimicrobial Agents Journal* 1: 9-19.

Monzote L, García M, Scull R, Cuellar A and Setzer WN. 2013. Antileishmanial Activity of the Essential Oil from *Bixa orellana*. *Phytotherapy research: n/a-n/a*.

Moore EM and Lockwood DN. 2011. Leishmaniasis. *Clinical Medicine* 11: 492-497.

Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, et al. 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine* 347: 2020-2029.

Morais-Teixeira Ed, Damasceno QS, Galuppo MK, Romanha AJ and Rabello A. 2011. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 106: 475-478.

More B, Bhatt H, Kukreja V and Ainapure SS. 2003. Miltefosine: great expectations against visceral leishmaniasis. *Journal of postgraduate medicine* 49: 101-103.

Moreira D, López-García P and Vickerman K. 2004. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54: 1861-1875.

Mukherjee AK, Gupta G, Bhattacharjee S, Guha SK, Majumder S, Adhikari A, Bhattacharya P, Majumdar SB and Majumdar S. 2010. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. *The Journal of infection* 61: 173-184.

Mukherjee P, Ghosh AK and Ghose AC. 2003. Infection pattern and immune response in the spleen and liver of BALB/c mice intracardially infected with *Leishmania donovani* amastigotes. *Immunology letters* 86: 131-138.

Mukherjee P, Majee SB, Ghosh S and Hazra B. 2009. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by diospyrin and its ethanolamine derivative. *International journal of antimicrobial agents* 34: 596-601.

Mukhopadhyay R, Mukherjee S, Mukherjee B, et al. 2011. Characterisation of antimony-resistant *Leishmania donovani* isolates: biochemical and biophysical studies and interaction with host cells. *International journal for parasitology* 41: 1311-1321.

Muniz-Junqueira MI and de Paula-Coelho VN. 2008. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, *in vitro*. *International immunopharmacology* 8: 1633-1638.

Murray HW. 2001. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45: 2185-2197.

Murray HW, Berman JD, Davies CR and Saravia NG. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-1577.

Murray HW, Montelibano C, Peterson R and Sypek JP. 2000. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of infectious diseases* 182: 1497-1502.

Navia MA. 2000. A chicken in every pot, thanks to sulfonamide drugs. *Science (New York, NY)* 288: 2132.

Navickiene HM, Bolzani Vda S, Kato MJ, Pereira AM, Bertoni BW, Franca SC and Furlan M. 2003. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemical analysis* 14: 281-284.

Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD and Chajón JF. 1992. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Journal of infectious diseases* 165: 528-534.

Neal R, Allen S, McCoy N, Olliaro P and Croft S. 1995. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 35: 577-584.

Nelson DJ, LaFon SW, Tuttle JV, Miller WH, Miller RL, Krenitsky TA, Elion GB, Berens RL and Marr JJ. 1979. Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent. Biological effects, metabolism, and enzymatic phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 254: 11544-11549.

- Neuber H. 2008. Leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 6: 754-765.
- Neumann A, Baginski M and Czub J. 2010. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets. *Journal of the American Chemical Society* 132: 18266-18272.
- Newman DJ and Cragg GM. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products* 75: 311-335.
- Nicolle C and Laveran A. 1908. Culture du parasite du bouton d'Orient: *Gauthiers-Villars*.
- Nielsen SF, Kharazmi A and Christensen SB. 1998. Modifications of the alpha,beta-double bond in chalcones only marginally affect the antiprotozoal activities. *Bioorganic Medicinal & Chemistry* 6: 937-945.
- Nocua P, Ramírez C, Requena JM and Puerta CJ. 2011. Secuencia parcial del genoma del maxicirculo de *Leishmania braziliensis*, comparación con otros tripanosomátidos. *Universitas Scientiarum* 16: 29-50.
- Nour AM, Khalid SA, Kaiser M, Brun R, Wai'l EA and Schmidt TJ. 2009. The antiprotozoal activity of sixteen Asteraceae species native to Sudan and bioactivity-guided isolation of xanthanolides from *Xanthium brasiliicum*. *Planta Medica* 75: 1363-1368.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T and Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267: 5421-5426.
- Obonaga R, Fernández OL, Valderrama L, Rubiano LC, del Mar Castro M, Barrera MC, Gomez MA and Saravia NG. 2013. Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*: 01023-01013.
- Okuno T, Goto Y, Matsumoto Y, Otsuka H and Matsumoto Y. 2003. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the β -galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. *Experimental animals* 52: 109-118.
- OPS/OMS. 2006. Leishmaniasis Visceral en las Américas. In Panaftosa editor. *Informe Final de la Reunión de Expertos Río de Janeiro: OPS/OMS*.
- Ordoñez-Gutierrez L, Espada-Fernandez R, Dea-Ayuela MA, Torrado JJ, Bolas-Fernandez F and Alunda JM. 2007. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *International journal of antimicrobial agents* 30: 325-329.
- Orhan I, Aslan M, Sener B, Kaiser M and Tasdemir D. 2006. *In vitro* antiprotozoal activity of the lipophilic extracts of different parts of Turkish *Pistacia vera* L. *Phytomedicine* 13: 735-739.
- Pan P, Vermelho AB, Capaci Rodrigues G, Scozzafava A, Tolvanen ME, Parkkila S, Capasso C and Supuran CT. 2013. Cloning, characterization, and sulfonamide and thiol inhibition studies of an alpha-carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry* 56: 1761-1771.
- Park JB. 2007. Caffedymine from cocoa has COX inhibitory activity suppressing the expression of a platelet activation marker, P-selectin. *Journal of Agriculture Food & Chemical* 55: 2171-2175.

- Parmar V, Jain S, Bisht K, Jain R, Taneja P and Jha A. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 597-673.
- Patterson TF, Minitier P, Dijkstra J, Szoka FC, Jr., Ryan JL and Andriole VT. 1989. Treatment of experimental invasive aspergillosis with novel amphotericin B/cholesterol-sulfate complexes. *The Journal of infectious diseases* 159: 717-724.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, et al. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics* 39: 839-847.
- Peixoto M and Beverley SM. 1987. In vitro activity of sulfonamides and sulfones against *Leishmania major* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31: 1575-1578.
- Peloi LS, Biondo CEG, Kimura E, Politi MJ, Lonardoni MVC, Aristides SMA, Dorea RCC, Hioka N and Silveira TGV. 2011. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Experimental Parasitology* 128: 353-356.
- Perez H, Arredondo B and Machado R. 1979. *Leishmania mexicana* and *Leishmania tropica*: cross immunity in C57BL/6 mice. *Experimental Parasitology* 48: 9-14.
- Perez-Victoria FJ, Sanchez-Canete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, Castanys S and Gamarro F. 2006. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 9: 26-39.
- Perkins SL and Schall J. 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology* 88: 972-978.
- Peters NC and Sacks DL. 2009. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cellular microbiology* 11: 1290-1296.
- Piarroux R, Fontes M, Perasso R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H and Quilici M. 1995. Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains revealed by analysis of a repetitive DNA sequence. *Molecular and biochemical parasitology* 73: 249-252.
- Piñero JE, Martinez S, del Castillo A, Portus M and Valladares B. 2002. In vitro susceptibility of *Leishmania infantum* strains isolated from Spanish HIV-positive patients to Abelcet and Fungizone. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 50: 304-306.
- Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, Papazoglou LG, Saridomichelakis MN, Savvas I and Leondides L. 2006. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Journal of veterinary internal medicine/American College of Veterinary Internal Medicine* 20: 228-233.
- Pleyer U, Legmann A, Mondino B and Lee D. 1992. Use of collagen shields containing amphotericin B in the treatment of experimental *Candida albicans*-induced keratomycosis in rabbits. *American Journal of Ophthalmology* 113: 303.
- Pradeep C and Kuttan G. 2003. Effect of piperine on the inhibition of nitric oxide (NO) and TNF- α production. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 25: 337-346.
- Pradeep C and Kuttan G. 2004. Piperine is a potent inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), c-Fos, CREB, ATF-2 and proinflammatory cytokine gene expression in B16F-10 melanoma cells. *International immunopharmacology* 4: 1795-1803.

- Proffitt RT, Satorius A, Chiang SM, Sullivan L and Adler-Moore JP. 1991. Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rodents. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 28 Suppl B: 49-61.
- Purkait B, Kumar A, Nandi N, et al. 2012. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56: 1031-1041.
- Qi H, Ji J, Wanasen N and Soong L. 2004. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infection & Immunity* 72: 988-995.
- Quijada L, Soto M, Alonso C and Requena JM. 1997. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. *Journal of Biological Chemistry* 272: 4493-4499.
- Quintana G and Vargas L. 1995. Guía popular de plantas utilizadas por los Mosestenes de Covendo, Santa Ana y Muchanes (Alto Beni, Bolivia). FONAMA, La Paz.
- Raay B, Medda S, Mukhopadhyay S and Basu MK. 1999. Targeting of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 36: 248-251.
- Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P and Loiseau P. 2007. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 1425-1430.
- Ralph P and Nakoinz I. 1975. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature* 257: 393-394.
- Ramírez CA, Requena JM and Puerta CJ. 2011. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. *Parasites & Vectors* 4: 166.
- Ramos-Santos C, Hernandez-Montes O, Sanchez-Tejeda G and Monroy-Ostria A. 2000. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) mexicana* in a Mexican patient with human immunodeficiency virus infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 733-738.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MNd, Marzal PC, Andrade Junior HFd and Tempone AG. 2003. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. *Química Nova* 26: 550-555.
- Raymond F, Boisvert S, Roy G, et al. 2012. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic acids research* 40: 1131-1147.
- Ready PD. 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual review of entomology* 58: 227-250.
- Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, et al. 2013. The Genome Sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional Annotation and Extended Analysis of Gene Models. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*.
- Remme JH, Blas E, Chitsulo L, et al. 2002. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends in parasitology* 18: 421-426.

- Requena JM, Chicharro C, García L, Parrado R, Puerta CJ and Cañavate C. 2012. Sequence analysis of the 3'-untranslated region of HSP70 (type I) genes in the genus *Leishmania*: its usefulness as a molecular marker for species identification. *Parasites & Vectors* 5: 87.
- Rey J, Travi B, Valencia A and Saravia N. 1990. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex *in vivo* and *in vitro*. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 43: 623-631.
- Richards TA and Cavalier-Smith T. 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436: 1113-1118.
- Ringwald P, Shallcross L, Miller JM and Seiber E. 2005. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring 1996-2004.
- Rioux J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P and Perieres J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*: Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 65: 111-125.
- Rocha MN and Horizonte B. 2013. Desenvolvimento de uma metodologia semi-automatizada para busca de novas drogas utilizando *Leishmania amazonensis* fluorescente. *Belo Horizonte* 104.
- Rodgers MR, Popper SJ and Wirth DF. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 71: 267-275.
- Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM and Glasebrook AL. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of immunological methods* 142: 257-265.
- Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, et al. 2011. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome research* 21: 2129-2142.
- Rogers WO and Wirth DF. 1987. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 565-569.
- Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M and Saravia NG. 2006. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *The Journal of infectious diseases* 193: 1375-1383.
- Romero GA, de Farias Guerra MV, Paes MG and de Oliveira Macêdo V. 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clinical infectious diseases* 32: 1304-1312.
- Ross R. 1903. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. *British medical journal* 2: 1261-1262.
- Rossi P-G, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert J-M, Costa J, Casanova J, Bolla J-M and Berti L. 2007. (E)-methyloisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *Journal of agricultural and food chemistry* 55: 7332-7336.
- Rotureau B, Ravel C, Nacher M, Couppié P, Curtet I, Dedet J-P and Carme B. 2006. Molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. *Journal of clinical microbiology* 44: 468-473.

- Roussaki M, Hall B, Lima SC, da Silva AC, Wilkinson S and Detsi A. 2013. Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone-chalcone series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett* 23: 6436-6441.
- Roy P, Das S, Auddy RG and Mukherjee A. 2012. Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis. *Journal of Cell and Animal Biology* 6: 73-87.
- Russell R, Pilar Iribar M, Lambson B, Brewster S, Blackwell JM, Dye C and Ajioka JW. 1999. Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Molecular and biochemical parasitology* 103: 71-77.
- Rzhetsky A and Nei M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Molecular Biology Evolution* 9: 945-967.
- Saarinen-Savolainen P, Järvinen T, Araki-Sasaki K, Watanabe H and Urtti A. 1998. Evaluation of cytotoxicity of various ophthalmic drugs, eye drop excipients and cyclodextrins in an immortalized human corneal epithelial cell line. *Pharmaceutics Research* 15: 1275-1280.
- Sabra R and Branch RA. 1992. Effect of amphotericin B on intracellular calcium levels in cultured glomerular mesangial cells. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 226: 79-85.
- Sacks D and Kamhawi S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual review of microbiology* 55: 453-483.
- Sacks D and Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews Immunology* 2: 845-858.
- Sacks DL, Kenney RT, Kreutzer RD, Jaffe CL, Gupta AK, Sharma MC, Sinha SP, Neva FA and Saran R. 1995. Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet* 345: 959-961.
- Sacks DL and Melby PC. 2001. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Current protocols in immunology*: 19.12. 11-19.12. 20.
- Sacks DL and Perkins PV. 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223: 1417-1419.
- Saha S, Mondal S, Ravindran R, et al. 2007. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. *Journal of Immunology* 179: 5592-5603.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4: 406-425.
- Salahuddin A, Inam A, van Zyl RL, Heslop DC, Chen C-T, Avecilla F, Agarwal SM and Azam A. 2013. Synthesis and evaluation of 7-chloro-4-(piperazin-1-yl) quinoline-sulfonamide as hybrid antiprotozoal agents. *Bioorganic & medicinal chemistry* 21: 3080-3089.
- Salem MM and Werbovetz KA. 2005. Antiprotozoal compounds from *Psoralea argyrea*. *Journal of Natural Products* 68: 108-111.
- Sambrook J, Russell DW and Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* 3set.

- Sampaio SA, Castro RM, Dillon NL and Martins JE. 1971. Treatment of mucocutaneous (American) leishmaniasis with amphotericin B: report of 70 cases. *International journal of dermatology* 10: 179-181.
- Sampaio SA, Godoy JT, Paiva L, Dillon NL and da LC. 1960. The treatment of American (mucocutaneous) leishmaniasis with amphotericin B. *Archives of dermatology* 82: 627-635.
- Sanchez-Brunete JA, Dea MA, Rama S, Bolas F, Alunda JM, Raposo R, Mendez MT, Torrado-Santiago S and Torrado JJ. 2004. Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 3246-3252.
- Sánchez-Cañete MP, Carvalho L, Pérez-Victoria FJ, Gamarro F and Castanys S. 2009. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53: 1305-1313.
- Sangüeza P and Cardenas F. 1980. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. New findings on the subject. *Medicina cutanea ibero-latino-americana* 9: 25-34.
- Santos AMd, Noronha EF, Ferreira LAM, Carranza-Tamayo CO, Cupolillo E and Romero GAS. 2008. Effect of a hydrophilic formulation of topical paromomycin on cutaneous leishmaniasis among patients with contraindications for treatment with pentavalent antimonials. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 444-448.
- Schoffski P, Freund M, Wunder R, Petersen D, Kohne CH, Hecker H, Schubert U and Ganser A. 1998. Safety and toxicity of amphotericin B in glucose 5% or intralipid 20% in neutropenic patients with pneumonia or fever of unknown origin: randomised study. *BMJ* 317: 379-384.
- Schönian G, Kuhls K and Mauricio IL. 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138: 405-425.
- Schönian G, Mauricio I and Cupolillo E. 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in parasitology* 26: 466-469.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W and Jaffe CL. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology & Infection Diseases* 47: 349-358.
- Schuster FL and Sullivan JJ. 2002. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clinical microbiology reviews* 15: 374-389.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D and Boyd MR. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 48: 4827-4833.
- Seifert K, Escobar P and Croft SL. 2010. *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 508-511.
- Selam J. 1997. Pharmacokinetics of hypoglycemic sulfonamides: Ozidia, a new concept]. *Diabetes & metabolism* 23: 39.
- Sen R and Chatterjee M. 2011. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine* 18: 1056-1069.

- Serafim TD, Figueiredo AB, Costa PAC, et al. 2012. *Leishmania* Metacyclogenesis Is Promoted in the Absence of Purines. *PLoS neglected tropical diseases* 6: e1833.
- Sereno D, Alegre AM, Silvestre R, Vergnes B and Ouaisi A. 2005. *In vitro* antileishmanial activity of nicotinamide. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49: 808-812.
- Sereno D, Cavaleira M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A and Lemesre J. 1998. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42: 3097-3102.
- Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F and Ouaisi A. 2007. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitology international* 56: 3-7.
- Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A and Lemesre JL. 2001. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45: 2064-2069.
- Serizawa K, Suzuki H and Tsuchiya K. 2000. A phylogenetic view on species radiation in Apodemus inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes. *Biochemical Genetics* 38: 27-40.
- Serrano DR, Ruiz-Saldana HK, Molero G, Ballesteros MP and Torrado JJ. 2012. A novel formulation of solubilised amphotericin B designed for ophthalmic use. *International Journal of Pharmaceutics* 437: 80-82.
- Serrano-Martín X, Payares G, De Lucca M, Martínez JC, Mendoza-León A and Benaïm G. 2009. Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53: 5108-5113.
- Shapiro TA, Klein VA and Englund PT. 1999. Isolation of kinetoplast DNA. In. *DNA Topoisomerase Protocols: Springer*. p. 61-67.
- Sharma U, Velpandian T, Sharma P and Singh S. 2009. Evaluation of anti-leishmanial activity of selected Indian plants known to have antimicrobial properties. *Parasitology Research* 105: 1287-1293.
- Shaw JJ. 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 471-478.
- Shimony O and Jaffe CL. 2008. Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania* amastigotes. *Journal of Microbiological Methods* 75: 196-200.
- Shoaib Ahmad Shah S, Rivera G and Ashfaq M. 2013. Recent Advances in Medicinal Chemistry of Sulfonamides. Rational Design as Anti-Tumoral, Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 13: 70-86.
- Sibley LD. 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunological reviews* 240: 72-91.
- Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR and Ishikawa E. 1987. Dermal leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp. n., a new parasite from the State of Pará. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82: 289-291.

- Sinagra Á, Luna C, Abraham D, Iannella MdC, Riarte A and Krolewiecki AJ. 2007. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 627-630.
- Sindermann H, Croft SL, Engel KR, Bommer W, Eibl HJ, Unger C and Engel J. 2004. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Medical microbiology and immunology* 193: 173-180.
- Singh GS, Al-kahraman YMSA, Mpadi D and Yasinzi M. 2012. Synthesis of N-(1-methyl-1H-indol-3-yl)methyleneamines and 3,3-diaryl-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)azetidin-2-ones as potential antileishmanial agents. *Bioorganic & Medical Chemistry Lett* 22: 5704-5706.
- Singh N, Gupta R, Jaiswal AK, Sundar S and Dube A. 2009. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable *ex vivo* drug screening. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64: 370-374.
- Singh R, Kumar D, Duncan RC, Nakhasi HL and Salotra P. 2010. Overexpression of histone H2A modulates drug susceptibility in *Leishmania* parasites. *International journal of antimicrobial agents* 36: 50-57.
- Singh S and Sivakumar R. 2004. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 10: 307-315.
- Sinha PK, Jha TK, Thakur CP, Nath D, Mukherjee S, Aditya AK and Sundar S. 2011. Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Journal of tropical medicine* 2011: 645203.
- Siqueira-Neto JL, Moon S, Jang J, et al. 2012. An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. *PLoS neglected tropical diseases* 6: e1671.
- Siqueira-Neto JL, Song O-R, Oh H, et al. 2010. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS neglected tropical diseases* 4: e675.
- Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P and Riscoe M. 2004. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 1803-1806.
- Sobarzo-Sánchez E, Bilbao-Ramos P, Dea-Ayuela M, et al. 2013. Synthetic oxoisoaporphine alkaloids: *in vitro*, *in vivo* and *in silico* assessment of antileishmanial activities. *PloS one* 8: e77560.
- Soto J, Arana BA, Toledo J, et al. 2004. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 38: 1266-1272.
- Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto P, Valda L and Berman JD. 2008. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 78: 210-211.
- Soto J, Rea J, Valderrama M, Toledo J, Valda L, Ardiles J and Berman J. 2009. Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 81: 387-389.

- Soto J, Toledo J, Valda L, et al. 2007. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clinical infectious diseases* 44: 350-356.
- Spotorno O AE, Córdova L and Solari I A. 2008. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 898-900.
- Srivastava S, Gupta M, Prajapati V, Tripathi A and Kumar S. 2001. Insecticidal activity of myristicin from Piper mullesua. *Pharmaceutical biology* 39: 226-229.
- Stackebrandt E and Goebel B. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 846-849.
- Staerk D, Lemmich E, Christensen J, Kharazmi A, Olsen CE and Jaroszewski JW. 2000. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from Corynanthe pachyceras. *Planta medica* 66: 531-536.
- Stechmann A and Cavalier-Smith T. 2002. Rooting the eukaryote tree by using a derived gene fusion. *Science* 297: 89-91.
- Stenger S and van Zandbergen G. 2011. Measuring the killing of intracellular pathogens: *Leishmania*. *Current protocols in immunology*: 14.23. 11-14.23. 12.
- Stevens MG and Olsen SC. 1993. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Journal of immunological methods* 157: 225-231.
- Suassuna I. 2006. Brasileiros pioneiros na história da microbiologia médica 2: Gaspar Vianna (1885-1914). *Revista Paraense de Medicina* 20: 71-73.
- Sundar S, Agrawal G, Rai M, Makharia M and Murray HW. 2001a. Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal amphotericin B: randomised trial. *British Medical Journal* 323: 419.
- Sundar S and Chakravarty J. 2008. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert opinion on investigational drugs* 17: 787-794.
- Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M and Murray HW. 2010. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *The New England journal of medicine* 362: 504-512.
- Sundar S and Chatterjee M. 2006. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *The Indian journal of medical research* 123: 345-352.
- Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC and Murray HW. 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 31: 1104-1107.
- Sundar S, Pai K, Kumar R, Pathak-Tripathi K, Gam AA, Ray M and Kenney RT. 2001b. Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 65: 193-196.

- Sundar S, Singh A, Agarwal D, Rai M, Agrawal N and Chakravarty J. 2009. Safety and efficacy of high-dose infusions of a preformed amphotericin B fat emulsion for treatment of Indian visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 80: 700-703.
- Sundar S, Sinha PK, Rai M, et al. 2011. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet* 377: 477-486.
- Sunila ES and Kuttan G. 2006. *Piper longum* inhibits VEGF and proinflammatory cytokines and tumor-induced angiogenesis in C57BL/6 mice. *International immunopharmacology* 6: 733-741.
- Suryawanshi SN, Kumar S, Shivahare R, Pandey S, Tiwari A and Gupta S. 2013. Design, synthesis and biological evaluation of aryl pyrimidine derivatives as potential leishmanicidal agents. *Bioorganic & Medical Chemistry Letter* 23: 5235-5238.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28: 2731-2739.
- Tandon J, Srivastava V and Guru P. 1991. Iridoids: a new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arborescens*. *Journal of natural products* 54: 1102-1104.
- Tang H, Zhao H-T, Zhong S-M, Wang Z-Y, Chen Z-F and Liang H. 2012. Novel oxoisoaporphine-based inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation. *Bioorganic Medical & Chemistry Letter* 22: 2257-2261.
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F and Rüedi P. 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50: 1352-1364.
- Tempone AG, da Silva AC, Brandt CA, Martinez FS, Borborema SE, da Silveira MA and de Andrade HF, Jr. 2005. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49: 1076-1080.
- Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux J, Pratlong F, Martini-Dumas A and Serres E. 1993. Phylogenetic taxonomy of new world *Leishmania*. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 68: 104-106.
- Thomsen V, Schatzlein D and Mercurio D. 2003. Limits of detection in spectroscopy. *Spectroscopy* 18: 112-114.
- Thornber C. 1979. Isosterism and molecular modification in drug design. *Chemical Society Reviews* 8: 563-580.
- Tintaya KWQ, Ying X, Dedet J-P, Rijal S, De Bolle X and Dujardin J-C. 2004. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *Journal of infectious diseases* 189: 1035-1043.
- Tisserand R and Balacs T. 1994. Nutmeg: A review of the toxicology and pharmacology of nutmeg and its essential oil. *International Journal Aromather Winter* 6: 28-38.

- Tiuman TS, Ueda-Nakamura T, Cortez DAG, Dias Filho BP, Morgado-Díaz JA, de Souza W and Nakamura CV. 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49: 176-182.
- Tong L and Yue T. 1988. [Effect of dauricine on rat and human platelet aggregation and metabolism of arachidonic acid in washed rat platelets]. *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica* 24: 85-88.
- Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP and Torrado-Santiago S. 2008. Amphotericin B formulations and drug targeting. *Journal of pharmaceutical sciences* 97: 2405-2425.
- Torres Espejo JM, Pratlong F, Le Pont F, Mouchet J, Desjeux P and Rioux J-A. 1989. Leishmaniasis in Bolivia: V. Human strains of *Leishmania* (V.) *braziliensis* from the department of Pando. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 84: 583-583.
- Torres-Santos E, Lopes D, Rodrigues Oliveira R, Carauta J, Bandeira Falcao C, Kaplan M and Rossi-Bergmann B. 2004. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine* 11: 114-120.
- Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MA, Meirelles MN and Rossi-Bergmann B. 1999a. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43: 1234-1241.
- Torres-Santos EC, Rodrigues JM, Moreira DL, Kaplan MAC and Rossi-Bergmann B. 1999c. Improvement of *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of 2', 6' -dihydroxy-4' -methoxychalcone by entrapment in poly (d, l-lactide) nanoparticles. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43: 1776-1778.
- Torrico F, Parrado R, Castro R, Marquez CJ, Torrico MC, Solano M, Reithinger R and García AL. 2009. Co-Infection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and HIV: report of a case of mucosal leishmaniasis in Cochabamba, Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 81: 555-558.
- Toté K, Vanden Berghe D, Levecque S, Bénéré E, Maes L and Cos P. 2009. Evaluation of hydrogen peroxide - based disinfectants in a new resazurin microplate method for rapid efficacy testing of biocides. *Journal of applied microbiology* 107: 606-615.
- Toutenburg H. 2008. Linear models and generalizations: least squares and alternatives: *Springer Series In Statistics* 3.
- Trotter ER, Peters W and Robinson BL. 1980. The experimental chemotherapy of leishmaniasis, VI. The development of rodent models for cutaneous infection with *L. major* and *L. mexicana amazonensis*. *Annals of tropical medicine and parasitology* 74: 299-319.
- Tsukayama P, Lucas C and Bacon DJ. 2009. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *International journal for parasitology* 39: 355-362.
- Valda Rodriguez L, Dedet J-P, Paredtes V, Mendoza C and Cardenas F. 1995. A randomized trial of amphotericin B alone or in combination with itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 90: 525-528.
- van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC and Ebeling SB. 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and biochemical parasitology* 51: 133-142.

- Vannier-Santos MA, Martiny A and de Souza W. 2002. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current pharmaceutical design* 8: 297-318.
- Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummelsmith J and Ouellette M. 2007. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Molecular & cellular proteomics* 6: 88-101.
- Verma NK and Dey CS. 2004. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 3010-3015.
- Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans J-P, Cos P and Maes L. 2009. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53: 3855-3859.
- Vickerman K. 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates. *Biology of the Kinetoplastida* 1: 1-34.
- Victoir K, Banuls A, Arevalo J, et al. 1998. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology-Cambridge* 117: 1-14.
- Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC and Romanha AJ. 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica* 90: 31-37.
- Vullo D, Innocenti A and Supuran CT. 2009. Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory activity: toward novel applications for sulfonamide drugs. *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*: 155-170.
- Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Kamat V, Martin S and Saha B. 2009. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. *Journal of Immunology* 182: 7146-7154.
- Werbovetz K, Brendle J and Sackett D. 1999. Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology* 98: 53-65.
- Werbovetz KA, Sackett DL, Delfín D, Bhattacharya G, Salem M, Obrzut T, Rattendi D and Bacchi C. 2003. Selective antimicrotubule activity of N1-phenyl-3, 5-dinitro-N4, N4-di-n-propylsulfanilamide (GB-II-5) against kinetoplastid parasites. *Molecular pharmacology* 64: 1325-1333.
- Wheeler RJ, Gluenz E and Gull K. 2011. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular microbiology* 79: 647-662.
- WHO. 1990. Lucha contra las leishmaniasis : informe de un Comité de Expertos de la OMS. In. Control of the leishmaniasis : *report of a WHO expert committee*: WHO. p. 172.
- WHO. 2008. Report Of The Consultative Meeting On Cutaneous Leishmaniasis. In. Neglected Tropical diseases Innovative and Intensified Disease Management, *Leishmaniasis Control Programme*. Geneva: WHO-HQ.
- WHO. 2010a. Control de las Leishmaniasis: *Informe de una reunión de expertos de la OMS*.
- WHO. 2010b. Costs of medicines in current use for the treatment of leishmaniasis.

WHO editor. Control of the leishmaniasis: *report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis*, Geneva. 2010c.

Williams C, Espinosa OA, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barria E and Romero LI. 2003. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *Journal of Microbiological Methods* 55: 813-816.

Wilson HR, Dieckmann BS and Childs GE. 1979. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: Experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Experimental Parasitology* 47: 270-283.

Wilson ME, Sandor M, Blum AM, Young BM, Metwali A, Elliott D, Lynch RG and Weinstock JV. 1996. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *Journal of Immunology* 156: 2231-2239.

Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP and Bastien P. 1996. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic acids research* 24: 1688-1694.

Wispelwey B and Pearson RD. 1991. Pentamidine: a review. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 12: 375-382.

Woo H-M, Kang J-H, Kawada T, Yoo H, Sung M-K and Yu R. 2007. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. *Life sciences* 80: 926-931.

Wright JH. 1903. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer ("Delhi Sore"). *The Journal of medical research* 10: 472-482 477.

Wyllie S, Cunningham ML and Fairlamb AH. 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of biological chemistry* 279: 39925-39932.

Xu W-H and Li X-C. 2011. Antifungal compounds from *Piper* species. *Current Bioactive Compounds* 7: 262-267.

Yang BB, Chen DL, Chen JP, Liao L, Hu XS and Xu JN. 2013a. Analysis of kinetoplast cytochrome b gene of 16 *Leishmania* isolates from different foci of China: different species of *Leishmania* in China and their phylogenetic inference. *Parasites & Vectors* 6: 32.

Yang TS, Ou KL, Peng PW, Liou BC, Wang WT, Huang YC, Tsai CM and Su CH. 2013b. Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells. *Biochimica et biophysica acta* 1828: 1794-1801.

Yardley V and Croft SL. 1997. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41: 752-756.

Yardley V, Croft SL, De Doncker S, Dujardin J-C, Koirala S, Rijal S, Miranda C, Llanos-Cuentas A and Chappuis F. 2005. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 73: 272-275.

Yatawara L, Le TH, Wickramasinghe S and Agatsuma T. 2008. Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of *Leishmania major*: gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*. *Gene* 424: 80-86.

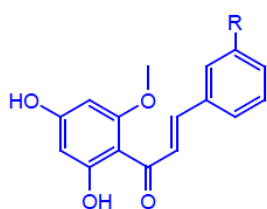
- Yeates C. 2002. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Current Opinion Investigation Drugs* 3: 1446-1452.
- Yu B-W, Chen J-Y, Wang Y-P, Cheng K-F, Li X-Y and Qin G-W. 2002. Alkaloids from *Menispermum dauricum*. *Phytochemistry* 61: 439-442.
- Yu B-W, Meng L-H, Chen J-Y, Zhou T-X, Cheng K-F, Ding J and Qin G-W. 2001. Cytotoxic Oxoisoaporphine Alkaloids from *Menispermum dauricum*. *Journal of natural products* 64: 968-970.
- Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA and Fischer SH. 2005. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 72: 415-420.
- Zemanová E, Jirků M, Mauricio IL, Horák A, Miles MA and Lukeš J. 2007. The *Leishmania donovani* complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *International journal for parasitology* 37: 149-160.
- Zhai L, Chen M, Blom J, Theander TG, Christensen SB and Kharazmi A. 1999. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43: 793-803.
- Zhang C-Y, Zhou J, Ding B, Lu X-J, Xiao Y-L, Hu X-S and Ma Y. 2013. Phylogenetic analysis of lack gene sequences for 22 Chinese *Leishmania* isolates. *Infection, Genetics and Evolution* 17: 79-86.
- Zhang X, Ye W, Zhao S and Che C-T. 2004. Isoquinoline and isoindole alkaloids from *Menispermum dauricum*. *Phytochemistry* 65: 929-932.

ANEXOS

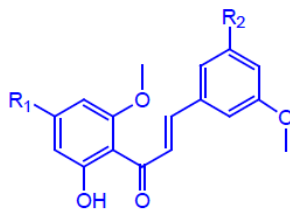
ANEXO 1

ESTRUCTURAS QUIMICAS

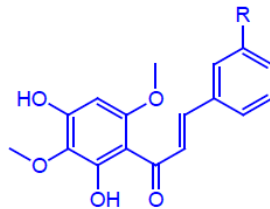
Piper delineatum: (FLAVONOIDES)



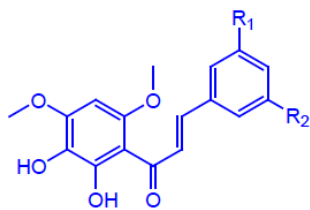
pdP1: R = OH
pdP23: R = OCH₃
pdP47: R = H



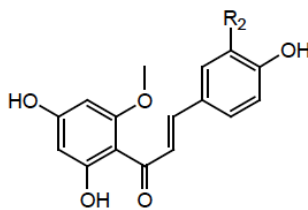
pdP2: R₁ = OH ; R₂ = OH
pdP5: R₁ = OCH₃ ; R₂ = OH
pdP38: R₁ = OCH₃ ; R₂ = H



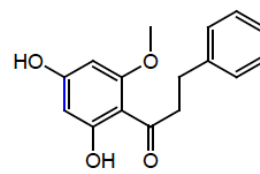
pdP33: R = OH
pdP21: R = O CH₃



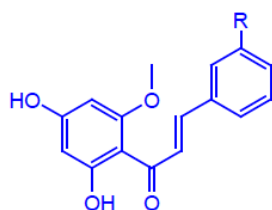
pdP3: R₁ = OH ; R₂ = OCH₃
pdP24: R₁ = H ; R₂ = H



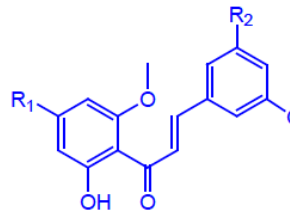
pdP17: R₁ = OH
pdP6: R₁ = OCH₃



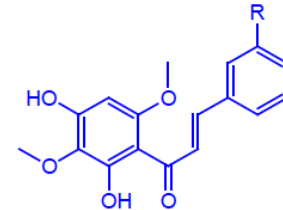
pdP37
Dihidrochalcona



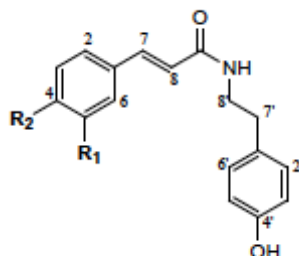
pdP18: R = OH
pdP16: R = OCH₃



pdP20: R₁ = H; R₂ = H
pdP31: R₁ = OCH₃; R₂ = OH

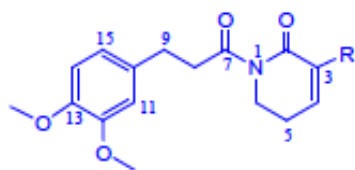


pdP29: R₁ = OH; R₂ = OCH₃
pdP28: R₁ = OH; R₂ = H
pdP10: R₁ = H; R₂ = OCH₃

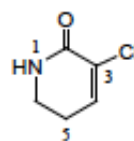


pdP13: (E) R₁ = H; R₂ = H

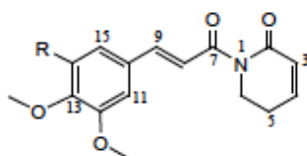
Estructuras Piper pseudoarboreum (Amidas)



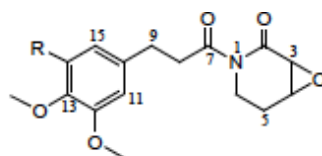
ppP15: R = Cl
ppP19: R = H



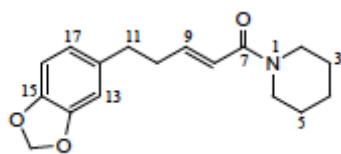
ppP2



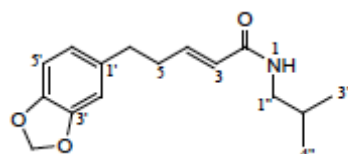
ppP12: (*E*) R = H
ppP13: (*E*) R = OCH₃
ppP14: (*Z*) R = OCH₃



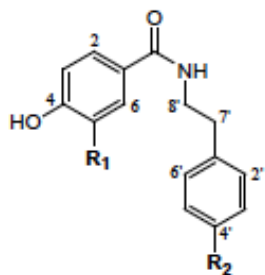
ppP18: R = H
ppP31: R = OCH₃



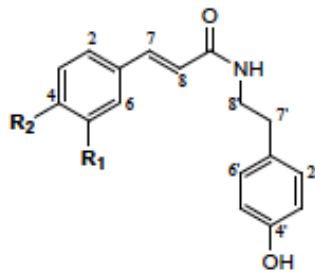
ppP27



ppP16



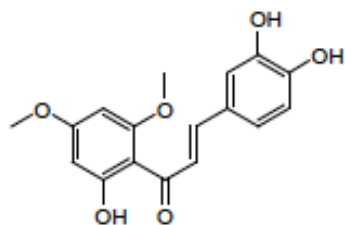
ppP18: R₁ = H ; R₂ = OCH₃
ppP31: R₁ = OH; R₂ = OH



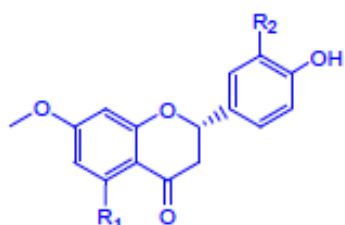
ppP10: (*E*) R₁ = H; R₂ = OH
ppP13: (*E*) R₁ = H; R₂ = H
ppP11: (*E*) R₁ = OCH₃; R₂ = OH
ppP11: (*Z*) R₁ = OCH₃; R₂ = OH

Estructuras *Piper divaricatum*:

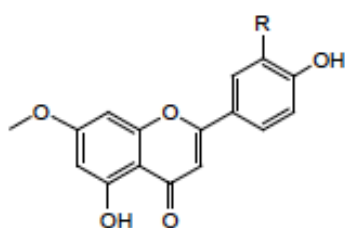
Flavonoides



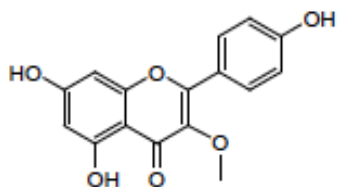
pvP29



pvP17: R₁ OCH₃; R₂ = OH
pvP20: R₁ = OH; R₂ = H

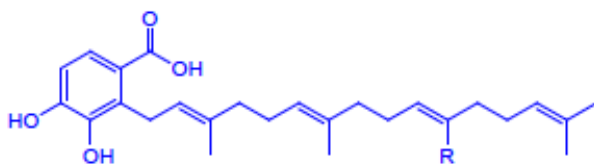


pvP8: R = H
pvP13: R = OH

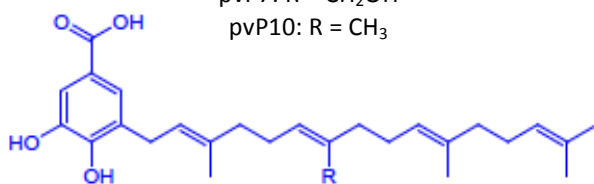


pvP19

Derivados del ácido benzoico

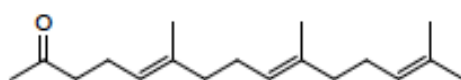


pvP6: R = COOH
pvP7: R = CH₂OH
pvP10: R = CH₃



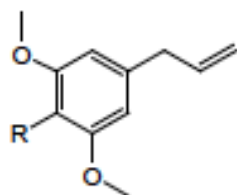
pvP6

Terpeno



pvP22

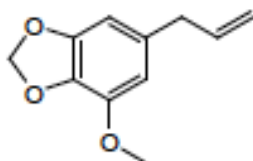
Fenil propanoides



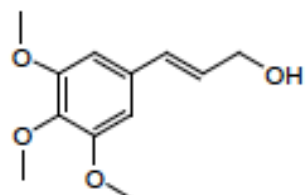
pvP24: R = OCH₃

pvP26: R = OAc

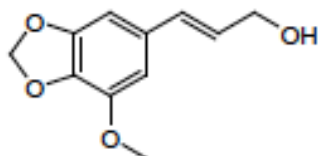
pvP27: R = OH



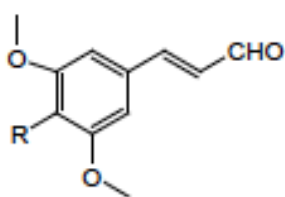
pvP25



pvP4

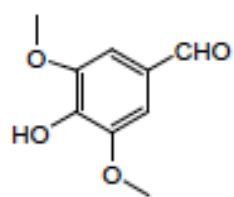


pvP3



pvP2: R = OH

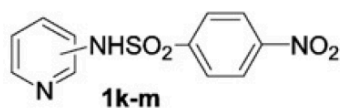
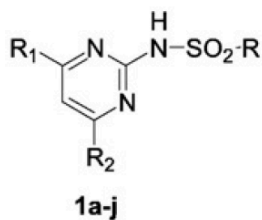
pvP18: R = OCH₃



pvP1

ESTRUCTURAS DE DERIVADOS DE SULFONAMIDAS

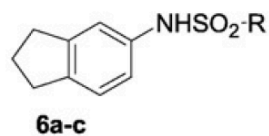
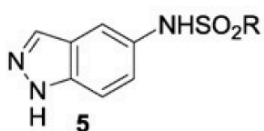
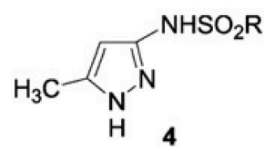
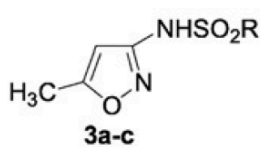
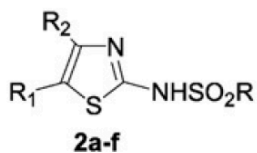
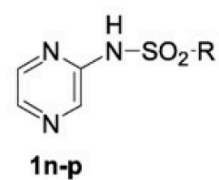
Serie 1



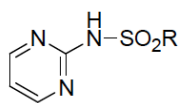
1k 2-(4-nitrobenzenesulfonamide)

1l 3-(4-nitrobenzenesulfonamide)

1m 4-(4-nitrobenzenesulfonamide)

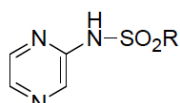


Serie 2



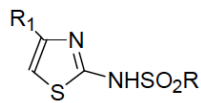
1a-c

1a R = 4-NO₂Ph
1b R = 4-CNPh
1c R = Naphtyl



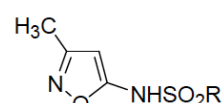
2a-d

a R = 4-NO₂Ph
b R = 4-CNPh
c R = 4-FPh
d = Naphtyl



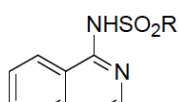
3a-e

3a R = 4-NO₂Ph R₁ = H
3b R = Ph R₁ = H
3c R = 4-NO₂Ph R₁ = CH₃
3d R = 4-ClPh R₁ = CH₃
3e R = Ph R₁ = CH₃



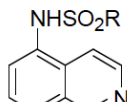
4a-c

4a R = 4-NO₂Ph
4b R = 4-ClPh
4c R = Ph



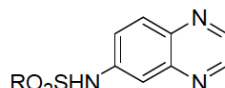
5a-d

5a R = 4-NO₂Ph
5b R = 4-ClPh
5c R = Ph
5d R = Naphtyl



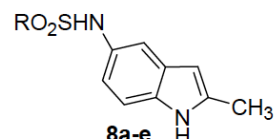
6a-e

6a R = 4-NO₂Ph
6b R = 4-ClPh
6c R = Ph
6d R = 4-FPh
6e R = Naphtyl



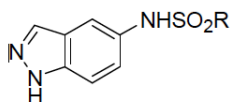
7a-e

7a R = 4-NO₂Ph
7b R = 4-ClPh
7c R = Ph
7d R = 4-FPh
7e R = Naphtyl



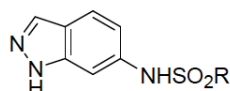
8a-e

8a R = 4-NO₂Ph
8b R = 4-ClPh
8c R = Ph
8d R = 4-FPh
8e R = Naphtyl



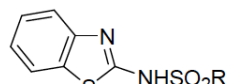
9a-e

9a R = 4-NO₂Ph
9b R = 4-ClPh
9c R = Ph
9d R = 4-FPh
9e R = Naphtyl



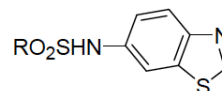
10a-e

10a R = 4-NO₂Ph
10b R = 4-ClPh
10c R = Ph
10d R = 4-FPh
10e R = Naphtyl



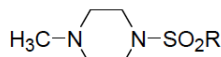
11a-c

11a R = 4-NO₂Ph
11b R = 4-ClPh
11c R = Ph



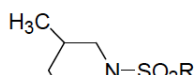
12a-d

12a R = 4-NO₂Ph
12b R = 4-ClPh
12c R = Ph
12d R = 4-FPh
12e R = Naphtyl



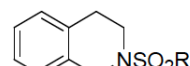
13a-d

13a R = 4-NO₂Ph
13b R = 4-ClPh
13c R = Ph
13d R = Naphtyl



14a-d

14a R = 4-NO₂Ph
14b R = 4-ClPh
14c R = Ph
14d R = Naphtyl

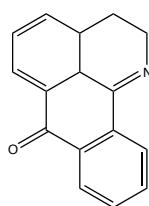


15a-d

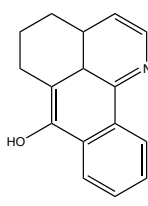
15a R = 4-NO₂Ph
15b R = 4-ClPh
15c R = Ph
15d R = Naphtyl

ESTRUCTURAS DE DERIVADOS DE OXOISOAPORFINAS

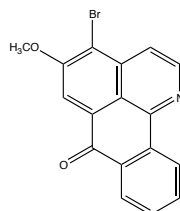
SERIE OXO



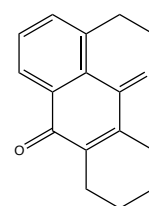
OXO 13



OXO 171

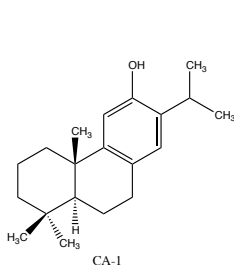


OXO 17

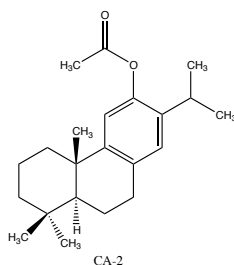


OXO 1

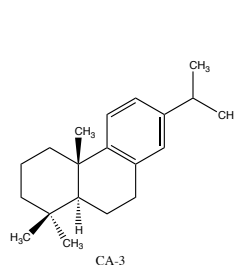
SERIE CA (1 – 15)



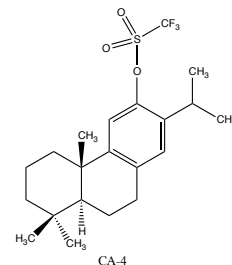
CA-1



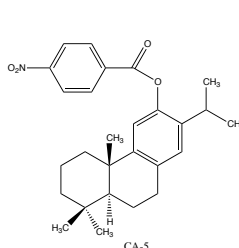
CA-2



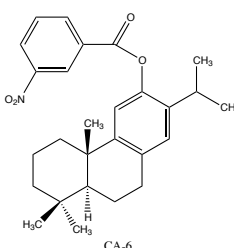
CA-3



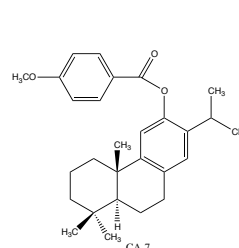
CA-4



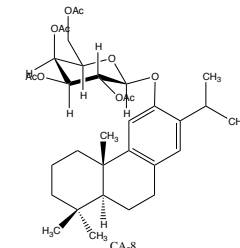
CA-5



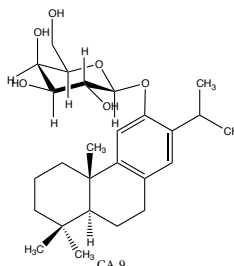
CA-6



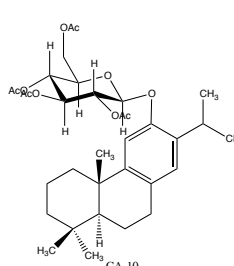
CA-7



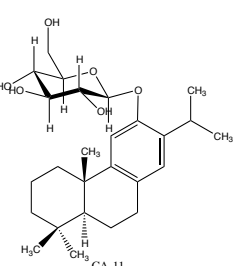
CA-8



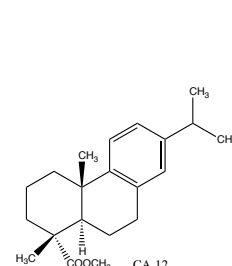
CA-9



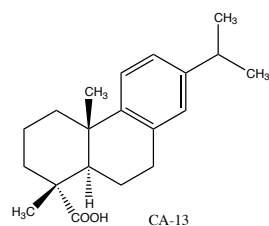
CA-10



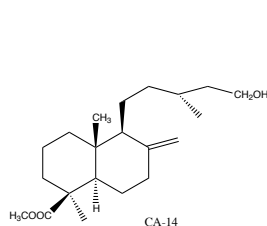
CA-11



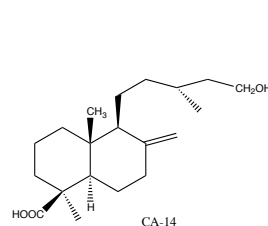
CA-12



CA-13

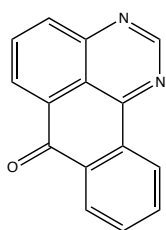


CA-14

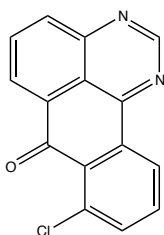


CA-15

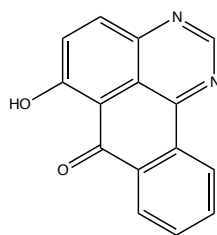
SERIE A (1 – 13)



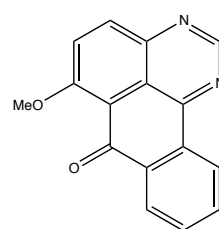
A1



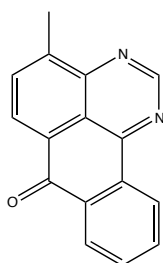
A2



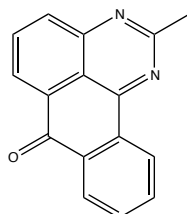
A3



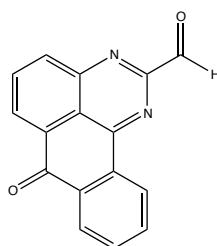
A4



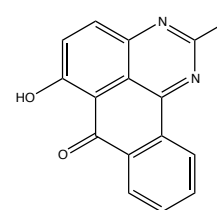
A5



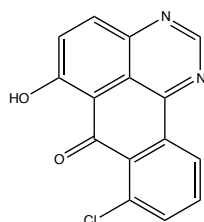
A6



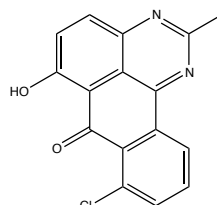
A7



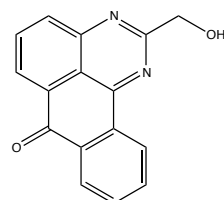
A8



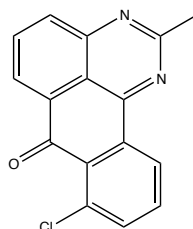
A9



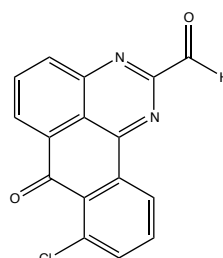
A10



A11

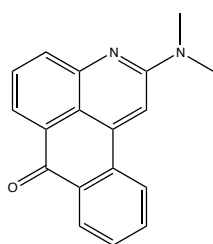


A12

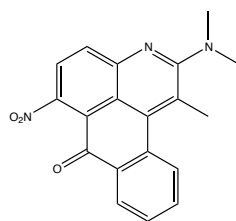


A13

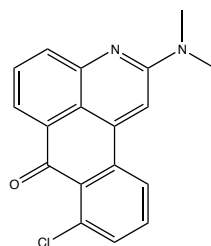
SERIE D (1 – 10)



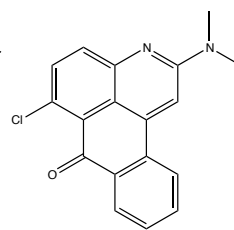
D 1



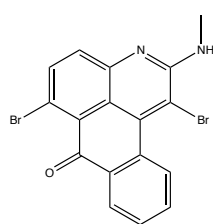
D 2



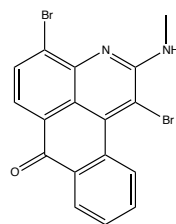
D 3



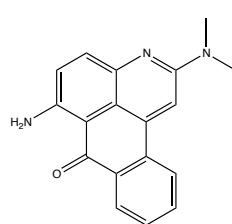
D 4



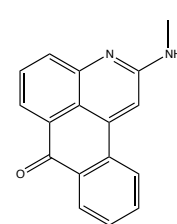
D 5



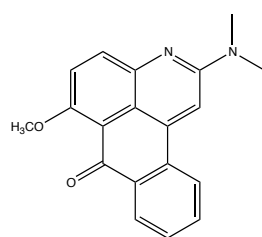
D 6



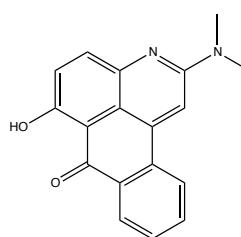
D 7



D 8

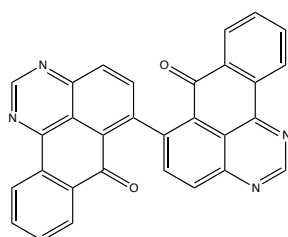


D 9

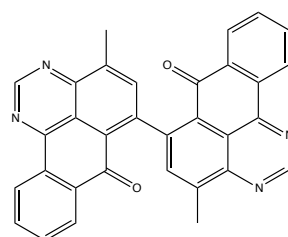


D 10

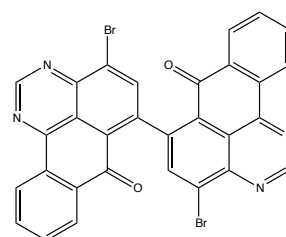
SERIE DIME y M1



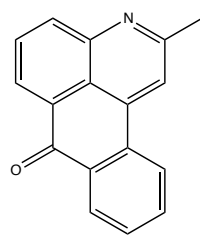
DIME 1



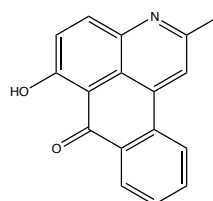
DIME 2



DIME 3

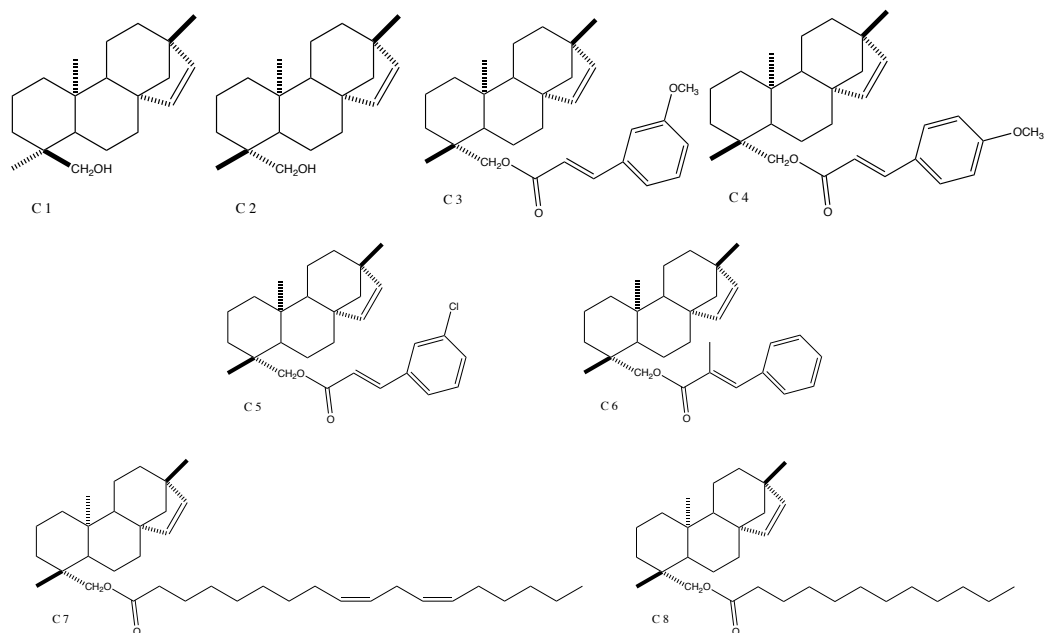


M 1

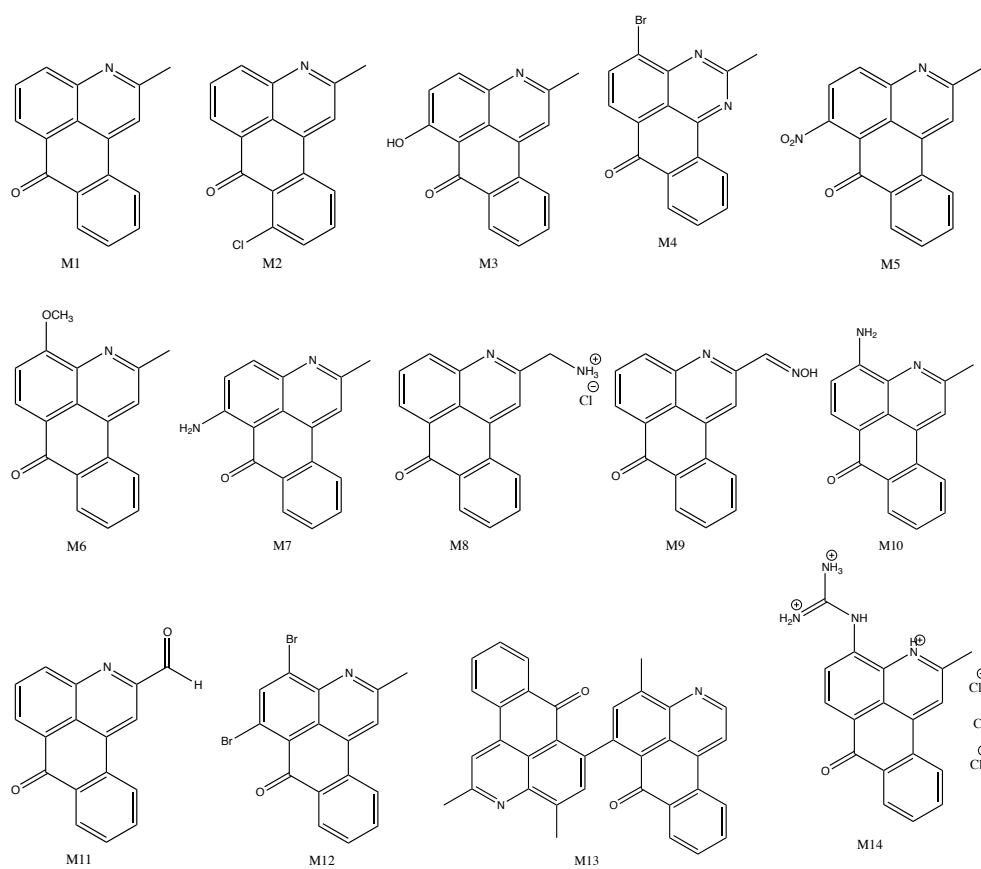


M 3

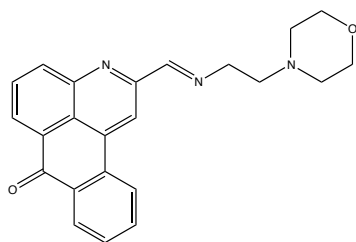
SERIE C (1 -8)



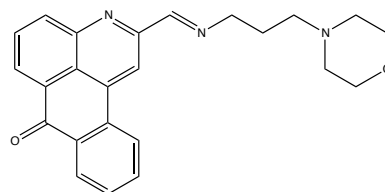
SERIE M (1 – 14) Naftoquinolinas



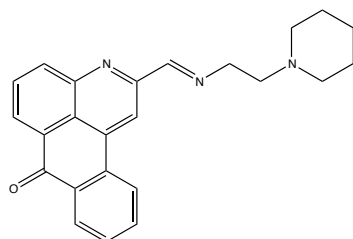
SERIE AC (1 – 7) Naftoquinolonas



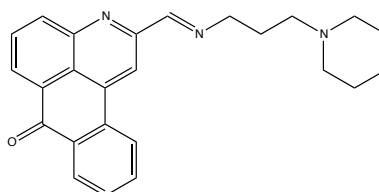
AC1



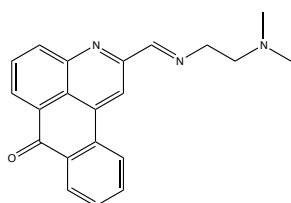
AC2



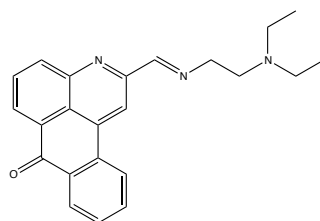
AC3



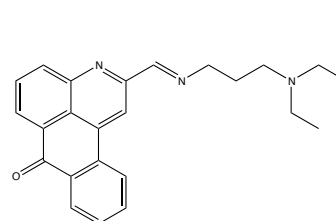
AC4



AC5

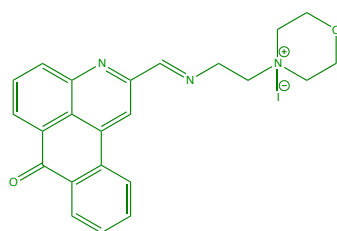


AC6

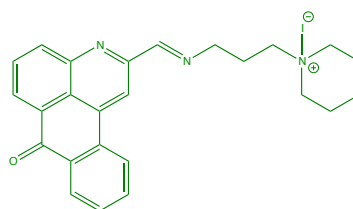


AC7

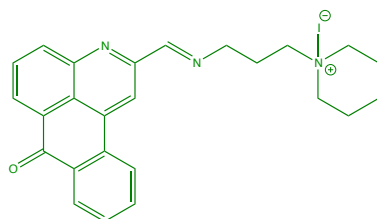
Serie AC (1⁺ – 4⁺) Naftoquinolonas



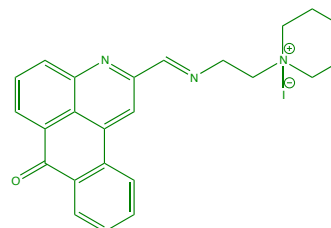
AC1+



AC2+



AC4+



AC3+

ANEXO 2

PATENTES



(11) Número de publicación: **2 387 440**

(21) Número de solicitud: 201001230

(51) Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **27.09.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.09.2012

(71) Solicitante/s:
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
AV. SENECA, 2
28040 MADRID, ES**

(72) Inventor/es:
**TORRADO DURAN, JUAN JOSE;
RUIZ SALDAÑA, HELGA KARINA;
SERRANO LOPEZ, DOLORES REMEDIOS;
MOLERO MARTIN-PORTUGUES, GLORIA;
NOMBELA CANO, CESAR;
BOLAS FERNANDEZ, FRANCISCO;
DEA AYUELA, MARIA AUXILIADORA;
BILBAO RAMOS, PABLO ESTANISLAO y
VEGAS SANCHEZ, MARIA DEL CARMEN**

(74) Agente/Representante:
No consta

(54) Título: **FORMULACIONES TOPICAS DE ANFOTERICINA B Y METODO DE OBTENCION**

(57) Resumen:

La invención se refiere a la preparación de nuevas formulaciones de anfotericina B de administración por vía tópica. En dichas formulaciones, la anfotericina B se encuentra formando un complejo con ciclodextrina. La poca afinidad de la anfotericina B por la ciclodextrina provoca la liberación de la mayor parte del antifúngico tras la administración de la formulación, ocasionando un aumento del efecto farmacológico de la anfotericina B gracias al cual ésta manifiesta acción antiparasitaria (antileishmaniosis) además de la acción antimicótica (cutánea, mucocutánea y superficial), principal indicación para la que se prescribe actualmente la anfotericina B. Para la preparación de estas formulaciones se utiliza una combinación de excipientes (además de la ciclodextrina que actúa como solubilizante), tales como viscosizantes, emulsificantes y excipientes grasos. En la presente invención se describe la preparación de formulaciones tópicas de anfotericina B, presentando cada o una de ellas una forma farmacéutica diferente: gel, crema, pomada y colirio.

ES 2 387 440 A1

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 402 253**

(21) Número de solicitud: 201101090

(51) Int. Cl.:

A61K 31/473 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCION

B1

(22) Fecha de presentación:

30.09.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

30.04.2013

Fecha de la concesión:

25.02.2014

(45) Fecha de publicación de la concesión:

04.03.2014

(73) Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (33.3%)
EDIFICIO EMPRENDIA CAMPUS VIDA
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES;
UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA
(33.3%) y
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(33.3%)**

(72) Inventor/es:

**SOBARZO SÁNCHEZ, Eduardo;
MARTÍNEZ UBEIRA, Florencio;
GONZÁLEZ DÍAZ, Humberto;
DEA-AYUELA, María Auxiliadora;
BOLÁS FERNÁNDEZ, Francisco y
BILBAO RAMOS, Pablo**

(74) Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

(54) Título: **USO DE OXISOAPORFINAS EN EL TRATAMIENTO CONTRA LA LEISHMANIOSIS.**

(57) Resumen:

Uso de oxisoaporfinas en el tratamiento contra la leishmaniasis. Se muestran los datos de actividad in vitro de compuestos con estructura de oxisoaporfinas frente a las especies del género Leishmania: L. amazonensis, L. infantum, L. braziliensis y L. guyanensis. La invención también se refiere a las formulaciones farmacéuticas comprendiendo estos compuestos.

ES 2 402 253 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

ANEXO 3

PUBLICACIONES

Journal of Microbiological Methods 89 (2012) 8–11



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth



Note

A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular *Leishmania* amastigotes

Pablo Bilbao-Ramos^a, Sergio Sifontes-Rodríguez^b,
María Auxiliadora Dea-Ayuela^c, Francisco Bolás-Fernández^{a,*}

^a Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040-Madrid, Spain

^b Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, CP 54830, Villa Clara, Cuba

^c Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular, Universidad CEU Cardenal Herrera, s/n, 46113-Moncada, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2011

Received in revised form 23 January 2012

Accepted 23 January 2012

Available online 28 January 2012

Keywords:

Leishmania

Drug screening

Intracellular amastigotes

Resazurin

ABSTRACT

In this work a simple and novel method to evaluate the efficacy of compounds on intracellular *Leishmania* amastigotes by using a fluorometric assay has been developed. The new method is sensitive, easy to perform and scalable for high throughput and therefore it could be validated for screening of new anti-leishmanial agents.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. The parasites are heterogenic with a life cycle involving 2 alternating hosts: the vertebrate mammals where the aflagellated form named amastigote lives inside macrophages and a phlebotomine insect of the genus *Phlebotomus* or *Lutzomyia* where the monoflagellated form named promastigote lives in the digestive tract. Leishmaniasis is a cosmopolitan parasitic zoonosis and, according to the World Health Organization (WHO), about 350 million people are at risk of being infected (WHO, 2010). It exhibits a wide range of clinical manifestations that can vary from benign self-curing cutaneous ulcers to the most severe visceral leishmaniasis which is lethal if untreated. Due to the lack of an effective vaccine, the control of the disease relies on chemotherapy, which is mainly based on pentavalent antimonial derivatives, the polyene antibiotic amphotericin B, the phosphocholine derivative miltefosine and the aminoglycoside antibiotic paramomycin (Seifert et al., 2010). However, the effectiveness of these compounds is limited and compromised by the serious side effects of some of them, the increased development of resistance in endemic areas as well as the high cost of low toxic formulations such as the liposomal amphotericin B (Ambisome®). Consequently, efficient cure of severe leishmaniasis (e.g. visceral or mucocutaneous forms) is far from being successfully achieved and therefore the search for safer new drugs or new formulation of the classical ones should be of first

priority. High throughput screening for the selection of active compounds against *Leishmania* spp. must be easy, reproducible and quick to perform. In addition, they must faithfully reflect the natural conditions of the parasite inside the host (Sereno et al., 2007). The methods that are currently being applied for the screening of new active compounds using either promastigotes or axenic amastigotes are based on microscopic counting, enzyme-colorimetric techniques or flow cytometry. Using intracellular amastigotes, a more reliable stage closer to the natural physiological conditions, microscopic counting is often replaced by flow cytometry with fluorescent markers, monoclonal antibodies or even with reporter genes in transfected cells (Sereno et al., 2007). However, all these techniques have several disadvantages as they could be difficult to perform, expensive and non scalable for automation. Besides, they do not provide information on parasite viability.

In this paper a new method, which could be easily adapted to semi-automated high-throughput screening, is developed by using intramacrophagic amastigotes. It is based on the combination of host cell lysis (Mauel et al., 1978; Kiderlen and Kaye, 1990; Chakour et al., 2009), followed by viable amastigotes transformation into promastigotes and proliferation, and the use of a fluorescent substrate to measure parasite concentration and viability.

To set the new assay up, two drugs among those currently marketed for the chemotherapy of leishmaniasis were selected as reference compounds: amphotericin B deoxycholate (fungizone®) and miltefosine. The former was provided by Bristol-Myers Squibb, SL for research purposes and the latter was purchased from Sigma® under the code M5571.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 1818; fax: +34 91 394 1815.
E-mail address: francisb@farm.ucm.es (F. Bolás-Fernández).

In vitro infections were carried out in the J774 macrophage cell line. It was purchased at the Centro de Investigaciones Biológicas of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, Spain) and maintained by periodical passages in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 0.48% HEPES, 0.12% sodium bicarbonate, 0.03% L-glutamine, 0.001% penicillin and 0.001% streptomycin at 37 °C in 5% CO₂ and 50% humidity. The MHOH/BR/79/MARIA strain of *Leishmania amazonensis* was kindly provided by Dr. Toraño from the Centro Nacional de Microbiología of the Instituto de Salud Carlos III (Madrid–Spain) and cryopreserved in liquid nitrogen (FBS with 5% DMSO) until use. Prior to *in vitro* infection assays, the parasite strain was activated by *in vivo* passage in golden hamster and then periodically passaged in Schneider's insect medium supplemented with 10% heat inactivated FBS, 0.4% HEPES, 0.04% sodium bicarbonate, 0.001% penicillin and 0.001% streptomycin under incubation at 26 °C.

The correlation between parasite number and fluorescence intensity was assessed in 96-well microtiter plates where 2-fold serial dilutions of promastigote suspensions were dispensed starting from 10⁵ up to 7.8 × 10³ in a final volume of 200 µL of Schneider's medium containing 10% of 2.5 mM resazurin. Incubation was carried out at 26 °C and the fluorescence intensity was measured in a Tecan I-control spectrofluorometer at 535_{ex}–590_{em} nm wavelength.

The minimal concentration of sodium dodecyl sulphate (SDS) for the selective lysis of macrophages was assayed in 96-well microtiter plates where 10⁵ macrophages/well in 200 µL culture medium were dispensed and incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂ in humidity chamber. After incubation, the culture medium was removed by centrifugation at 1,500g for 5 min (centrifuge 5403 Eppendorf) and replaced by the lysis solution consisting of 10.4 g/L RPMI-1640, 0.48% HEPES and SDS ranging from 0.01 to 0.001% (Mauel et al., 1978; Kiderlen and Kaye, 1990) and incubated for 20 min at room temperature. Thereafter, the treated cells were harvested (centrifugation at 1,500g for 5 min), the supernatants were replaced by 200 µL of culture medium with 2.5 mM resazurin, and then the plates were incubated for 3 h at 37 °C and 5% CO₂ in humidity chamber. Afterwards, the shift of resazurin to its fluorescent form mediated by viable cells was measured in a Tecan I-control spectrofluorometer at 535_{ex}–590_{em} nm wavelength. Cell viability was estimated from fluorescence intensity and the minimal lethal concentration of SDS was determined as the lowest concentration able to completely inhibit the reduction of resazurin in cell suspension compared to control SDS-free cultures.

To set up the fluorometric assay for drug screening against intracellular amastigotes, 5 × 10⁴ macrophages and stationary promastigotes in a 1:10 rate were seeded in each well of a microtiter plate, suspended in 200 µL of culture medium and incubated for 24 h at 33 °C, 5% CO₂ in humidity chamber. After this first incubation, the temperature was increased up to 37 °C for another 24 h. Thereafter, cells were washed several times in culture medium by centrifugation at 1,500g for 5 min in order to remove free non-infective promastigotes. Finally, the supernatant was replaced by 200 µL/well of culture medium containing 2-fold serial dilutions of the test drugs, ranging from 10 µg/mL to 0.078 µg/mL for fungizone® and from 50 µg/mL to 0.39 µg/mL for miltefosine, in a triplicate assay. Following incubation for 48 h at 37 °C, 5% CO₂ in humidity chamber, the culture medium was replaced by 200 µL/well of the lysis solution (RPMI-1640 with 0.048% HEPES and 0.006% SDS as previously established) and incubated at room temperature for 20 min. Thereafter, the plates were centrifuged at 1,500g for 5 min and the lysis solution was replaced by 200 µL/well of Schneider's insect medium. The culture plates were then incubated at 26 °C for other 3 days to allow transformation of viable amastigotes into promastigotes and proliferation. Afterwards, 20 µL/well of 2.5 mM resazurin was added and left for another 3 h incubation. Finally, fluorescence emission was measured as described above.

Microscopic counting of intracellular amastigotes assay was carried out in parallel to the fluorometric assay described above, but using 8 well lab-Tek® Chamber Slides (Brand Products) where 5 × 10⁴ J774 macrophages and stationary promastigotes at a 1:10 ratio in 200 µL/well of culture medium were seeded and incubated at 33 °C and 5% CO₂ in humidity chamber for the first 24 h. Afterwards the temperature was raised up to 37 °C and 24 h later the cells were washed for several times in culture medium in order to remove non-infecting promastigotes. Thereafter, the test drugs were added following exactly the same protocol as the one followed in the fluorometric assay. After 48 h incubation, the supernatant from each well was discarded, the wells removed and the cells adhered to the slides were allowed to dry, fixed in methanol and stained with 10% Giemsa. After that, the number of amastigotes present into 100 to 200 macrophages was counted under light microscope. Parasite viability (%) in each culture was calculated with respect to the untreated culture wells.

The correlations between promastigote density and the relative fluorescence units were assessed by linear regression with estimation of the coefficient of determination (R^2). Fifty percent inhibitory concentrations (IC₅₀) and 90% inhibitory concentrations (IC₉₀) for both fluorometric and microscopic methods were estimated by probit analysis of concentration vs. parasite viability curves (Finney, 1947). To compare results of both techniques the Mann–Whitney *U* test was applied. Values of *p* under 0.05 were considered significant. All the statistical analyses were performed by using the SPSS v15.0 and Microsoft Excel 2007 software.

As clearly shown in Fig. 1, following incubation for 3 h at 26 °C, fluorescence intensity expressed as the percentage of relative fluorescence units (RFU) of resazurin upon reduction into resofurin is directly proportional to parasite density at a $R^2 = 0.9947$, with a sensitivity limit of 5 × 10³ parasites suspended in 200 µL of culture medium per well (SD of 1–6%).

Fig. 2 summarizes the percentage of macrophages lysed after treatment with the lysis solution at increasing concentrations of SDS (from 0.001 to 0.01%) in three independent experiments (test 1, test 2 and test 3). The minimal concentration of SDS able to lyse 95% of macrophages as assessed by visual estimation was set at 0.006%. That is why, all the subsequent assays were conducted using such concentration of SDS.

The pharmacological activity of the two test compounds, as estimated by the new fluorometric method and by the parasite microscopic counting was compared. The results of three independent experiments are depicted in Fig. 3. Plotting the percentage of growth inhibition versus increasing concentrations of fungizone® (Fig. 3A) and miltefosine (Fig. 3B) showed an overall high degree of coincidence between the fluorometric and the microscopic methods.

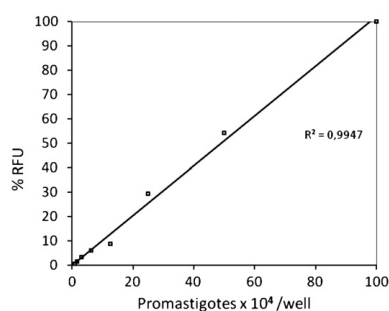


Fig. 1. Relationship between the number of promastigotes and the relative units of fluorescence (% RFU). Standard deviation (SD) = 1%–6%.

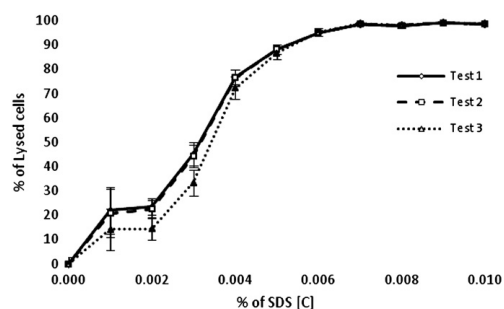


Fig. 2. Percentage of J774 macrophage lysis at different sodium dodecyl sulphate concentrations. The curves represent the mean values in a triplicate assay.

The comparison of the leishmanicidal activity (IC_{50} , IC_{90}) of each compound as assessed by both methods is summarized in Table 1. For miltefosine, mean values of IC_{50} and IC_{90} of microscopic versus fluorometric method were 5.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs. 4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 22.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs. 13.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Similarly for fungizone®, an IC_{50} of 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs. 0.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and IC_{90} of 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs. 1.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively for microscopic versus fluorometric method were recorded. Statistical analysis showed no significant difference between IC_{50} and IC_{90} as estimated for the two drugs by the microscopic and fluorometric

Table 1
Comparison of *in vitro* anti-leishmanial activity of miltefosine and fungizone® against intracellular amastigotes as measured by microscopy or fluorometric methods.

Test N°	Miltefosine				Fungizone®			
	IC_{50}		IC_{90}		IC_{50}		IC_{90}	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Test 1	7.39	3.91	22.87	10.56	0.20	0.51	0.68	1.16
Test 2	6.33	3.96	35.10	16.59	0.34	0.37	1.11	1.19
Test 3	2.10	5.93	9.63	14.48	0.61	0.50	3.91	1.08
Mean	5.27	4.60	22.53	13.88	0.38	0.46	1.90	1.15
SD	2.80	1.15	12.74	3.06	0.21	0.08	1.75	0.06

M = microscopy.

F = fluorometry.

methods ($p=0.7$ and $p=1.0$ for miltefosine ; $p=0.7$ and $p=0.7$ for fungizone®, respectively).

In the present paper a new method for *in vitro* screening of anti-leishmanial drugs has been developed, which offers clear advantages over those previously described which are currently in use. At present times, *in vitro* assays exclusively based on promastigotes are not longer acceptable as they do not resemble the physiological conditions of the parasite inside the vertebrate host. Alternatively, in order to overcome this drawback, extracellular amastigotes or amastigote-like forms have been produced by applying various protocols (Callahan et al., 1997; Sereno and Lemesre, 1997) but the results from those tests are somewhat inconsistent and still remain far from reproducing the clinical conditions of *Leishmania* infections. Currently, there is a consensus that intracellular amastigotes are with no doubt the proper stage for *in vitro* evaluation of potential new leishmanicidal or leishmaniostatic agents. Nevertheless, several difficulties are associated to this model system, mainly related to the way in which the pharmacological effectiveness of the drug is assessed. Microscopical counting of Giemsa stained infected cells is still the most used method (Lackovic et al., 2010). However, this method is tedious and demands personal experience to achieve a high reproducibility. Therefore, progresses have been made introducing colorimetric reagents such as Alamar Blue® (Mikus and Steverding, 2000) or using cells transfected with the fluorescence green protein followed by flow cytometry counting (Varela et al., 2009; Singh et al., 2009). Another limitation of those methods is that they cannot discriminate between leishmanicidal and leishmaniostatic activities of the test drugs and therefore a step forward was the introduction of radiolabeled markers such as methyl (SH) thymidine, (^3H) uracile and the chromophore MTT (Mauel et al., 1978; Berman and Gallalee, 1985; Kiderlen and Kaye, 1990) to measure macrophage activation as an indirect indicator of intracellular parasite survival.

These problems seem to be avoided by the method developed here in. By combining SDS-macrophage lysis with the use of resazurin, a non toxic fluorometric reagent widely used in toxicity studies as well as in viability and cell proliferation assays (Czekanska, 2011), we were able to measure the effect of drugs as well as parasite survival capacity upon subsequent transformation into promastigotes. In addition, this new method is highly sensitive and suitable for quantification of viable parasites with excellent linear correlation ($R=0.9947$) and also highly concordant with microscopic counting. The method is easy to perform, adaptable for large-scale procedures and therefore suitable for validation for pharmacological screening of anti-leishmanial drugs.

Acknowledgments

This work has been funded by Project AECID A-024457/09. Pablo Bilbao is recipient of a MAEC-AECID pre-doctoral fellowship.

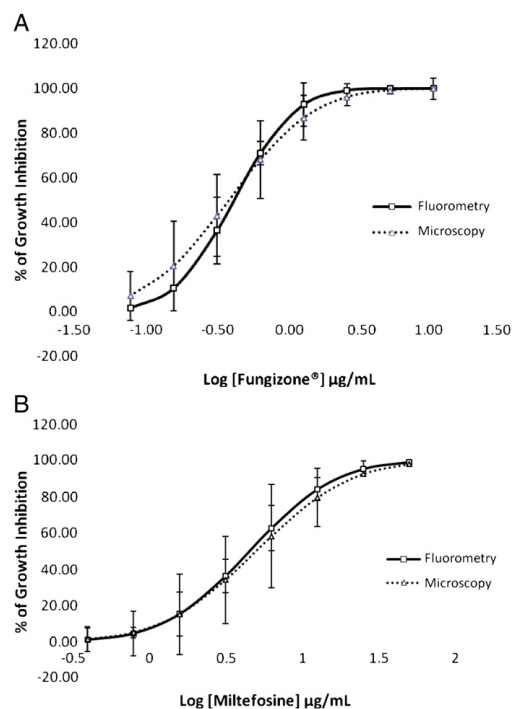


Fig. 3. Comparative inhibition growth patterns of fungizone® (3A) and miltefosine (3B) as assessed by the fluorometric (solid line) and microscopic counting (dotted line) methods.

References

- Berman, J., Gallalee, J., 1985. Semiautomated assessment of *in vitro* activity of potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28, 723–726.
- Callahan, H.L., Portal, A.C., Devereaux, R., Grogl, M., 1997. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 818–822.
- Chakour, R., Allenbach, C., Desgranges, F., Charmoy, M., Mauel, J., Garcia, I., et al., 2009. A new function of the Fas–FasL pathway in macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 86, 81–90.
- Czekanska, E.M., 2011. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. In: Stoddart, M.J. (Ed.), *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology). Humana Press, Totawa NJ, pp. 27–32. New York.
- Finney, D.J., 1947. Probit Analysis, a Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. first ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kiderlen, A.F., Kaye, P.M., 1990. A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *J. Immunol. Methods* 127, 11–18.
- Lackovic, K., Parisot, J., Sleebs, N., Baell, J., Debien, L., Watson, K., et al., 2010. Inhibitors of *Leishmania* GDP-mannose pyrophosphorylase identified by high-throughput screening of small-molecule chemical library. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1712–1719.
- Mauel, J., Buchmüller, Y., Behin, R., 1978. Studies on the mechanisms of macrophage activation. I. Destruction of intracellular *Leishmania enriettii* in macrophages activated by cocultivation with stimulated lymphocytes. *J. Exp. Med.* 148, 393–407.
- Mikus, J., Steverding, D., 2000. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue®. *Parasitol. Int.* 48, 265–269.
- Seifert, K., Escobar, P., Croft, S.L., 2010. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 508–511.
- Sereno, D., Lemesre, J.L., 1997. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 972–976.
- Sereno, D., Cordeiro-da-Silva, A., Mathieu-Daude, F., Ouassii, A., 2007. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol. Int.* 56, 3–7.
- Singh, N., Gupta, R., Jaiswal, A., Sundar, S., Dube, A., 2009. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable *ex vivo* drug screening. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 370–374.
- Varela, R., Muñoz, D., Robledo, S., Kolli, B., Dutta, S., Chang, K., et al., 2009. *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*: an *in vitro* assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Exp. Parasitol.* 122, 134–139.
- WHO, 2010. "Control of the leishmaniases" Technical Report Series. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parint

Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities

Pablo Bilbao-Ramos ^a, Cristina Galiana-Roselló ^b, M. Auxiliadora Dea-Ayuela ^{a,b}, Marta González-Alvarez ^c, Celeste Vega ^d, Miriam Rolón ^d, Jorge Pérez-Serrano ^e, Francisco Bolás-Fernández ^a, M. Eugenia González-Rosende ^{b,*}

^a Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University Complutense of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040-Madrid, Spain

^b Department of Chemistry, Biochemistry and Molecular Biology, University CEU-Cardenal Herrera, Avda. Seminario s/n, 46113-Moncada, Spain

^c Faculty of Pharmacy, University Miguel Hernández of Elche, Ctra. Nacional 332 s/n, 03550-Sant Joan D'Alacant, Spain

^d Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Pai Perez 165 c/ Mariscal Estigarribia, Asunción, Paraguay

^e Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University Alcalá de Henares, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871-Alcalá de Henares, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2012

Received in revised form 9 May 2012

Accepted 10 May 2012

Available online xxxxx

Keywords:

Leishmania spp.

Trypanosoma cruzi

Electron microscopy

Nuclease activity

Sulfonamides

ABSTRACT

Our aim was to evaluate the *in vitro* efficacy of a series of *N*-benzenesulfonamides of amine substituted aromatic rings, sulfonamides **1–6**, against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. and to compare their trypanocidal and leishmanicidal profile. In order to elucidate the probable mechanism of action, the interaction of selected sulfonamides with pUC18 plasmid DNA was investigated by nuclease activity assays. In addition, the cellular targets of these sulfonamides in treated parasites were also searched by transmission and scanning electron microscopy. The most active compounds 4-nitro-*N*-pyrimidin-2-ylbenzenesulfonamide **1a** and 4-chloro-*N*-5-methyl-thiazol-2-yl-benzenesulfonamide **2d** displayed significant *in vitro* activity against *Leishmania* spp. promastigotes, without toxicity to J774 macrophages. Selected sulfonamides **1a**, 4-nitro-*N*-pyrazin-2-yl-benzenesulfonamide **1n** and **2d** were also active against *Leishmania infantum* intracellular amastigotes. Compounds **1n** and **2d** showed nuclease activity in the presence of copper salt analogous to our previous results with sulfonamide **1a**. Mechanistic data reveal the involvement of a redox process. Evidence for the formation of reactive oxygen species (ROS) responsible for DNA strand scission is provided for sulfonamides **1a**, **1n** and **2d**. Transmission electron microscopic (TEM) analysis of *L. infantum* promastigotes treated with compounds **1a**, **1n** and **2d** shows an overall cellular disorganization effects which are mainly addressed to DNA bearing structures such as the nucleus, mitochondria and kinetoplast. Disruption of double nuclear membrane and loss of cellular integrity along with accumulation of cytoplasmic electrodense bodies were also frequently observed.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Protozoa of the order Kinetoplastida are the causative agents of a number of human and animal diseases including Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) and leishmaniasis (*Leishmania* spp.) [1]. These infections have a large disease burden [2,3]. However, few therapeutic agents are currently available. Moreover, many of them produce adverse side effects, in certain cases with high toxicity, require inconvenient routes of administration, long-term treatments and show low activity in immunosuppressed patients [4–6]. In addition, the widespread development of resistance by some parasite strains such as *T. cruzi* resistant to benznidazole and nifurtimox and *Leishmania* to antimonial compounds constitutes an important health problem [7,8]. Therefore there is an urgent need for the

discovery of new therapeutics displaying antitrypanosomal and leishmanicidal activities [9,10].

It is well-known that the sulfonamide pharmacophore is an important structural core in medicinal chemistry that shows a broad spectrum of pharmacological activities. Several compounds containing the sulfonamide scaffold have been used as antimicrobial drugs [11,12], diuretics [13,14], hypoglycemics [15,16], antithyroid agents [17], antitumor [18–21], antiviral drugs [22–24] and a number of other biological activities. In addition, the antiparasitic activity of several benzenesulfonamides has been reported [25–33]. Thus *in vitro* anti-leishmanial and trypanocidal effects of compounds containing the sulfonamido moiety have been shown [34–44]. However, a limited number have been tested in a murine animal model and neither of them displayed significant *in vivo* activity. In this context, we have previously demonstrated the anti-leishmanial *in vivo* efficacy of 4-nitro-*N*-pyrimidin-2-ylbenzenesulfonamide **1a** and 4-nitro-*N*-pyrazin-2-yl-benzenesulfonamide **1n** against *L. infantum* [45].

Herein our initial work on a series of *N*-substituted benzenesulfonamides **1–6** with antiprotozoal activity against *L. infantum*

* Corresponding author. Tel.: +34 961 369 000; fax: +34 961 395 272.

E-mail address: eugenia@uch.ceu.es (M.E. González-Rosende).

has been extended to four parasites: *Leishmania guayanensis*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*, etiological agents responsible for most of the cases of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (CL, MCL) [46], and *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease, the largest parasitic disease burden on the American continent [47] (Table 1). In this study, we report on the *in vitro* activity spectrum of sulfonamides **1–6** against both *Leishmania* spp. promastigote forms and *T. cruzi* epimastigotes. The most interesting compounds were also investigated on intracellular amastigote forms of *L. infantum*.

Nuclease activity studies of selected sulfonamides were carried out to elucidate the probable mechanism of action. In addition, the cellular targets in parasites of these sulfonamides were sought by transmission electron microscopy (TEM) and by scanning electron microscopy (SEM) analysis.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and reagents

Sulfonamides **1–6** were prepared as previously reported by our group [45]. Resazurin sodium salt was obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, USA and stored at 4 °C protected from light. The solution of resazurin

was prepared at 2.5 mM in phosphate buffered saline solution (PBS), pH 7.4, and filtered through 0.22 µm prior use. Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) was dissolved in 0.9% Triton X-100 (pH 7.4). Reference drugs (miltefosine and benznidazole) were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal assays

2.2.1. *In vitro* leishmanicidal assays

2.2.1.1. Parasites and culture procedure. The following species of *Leishmania* were used: an autochthonous isolate of *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN83) obtained from an asymptomatic dog from the Priorat region (Catalonia, Spain), kindly given by Prof. Montserrat Portús (Universitat de Barcelona), *L. braziliensis* 2903, *L. amazonensis* (MHOM/Br/79/Maria) and *Leishmania guyanensis* 141/93, kindly provided by Prof. Alfredo Torano (Instituto del Salud Carlos III, Madrid). Promastigotes were cultured in Schneider's Insect Medium (Sigma, St. Louis, MO) at 26 °C supplemented with 20% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (Sigma, St. Louis, MO) and 100 U/mL of penicillin plus 100 µg/mL of streptomycin (Sigma, St. Louis, MO) in 25 mL culture flasks.

Table 1
Sulfonamides evaluated against *Leishmania* spp. and *T. cruzi*.

Compound	R	R ₁	R ₂
1a	4-NO ₂ Ph	H	H
1b	2-NO ₂ Ph	H	H
1c	CH ₃	H	H
1d	3-NO ₂ Ph	H	H
1e	Ph	H	H
1f	4-FPh	H	H
1g	4-ClPh	H	H
1h	4-CH ₃ OPh	H	H
1i	4-NO ₂ Ph	CH ₃	CH ₃
1j	4-ClPh	CH ₃	CH ₃
1k	–	–	–
1l	–	–	–
1m	–	–	–
1n	4-NO ₂ Ph	–	–
1o	4-ClPh	–	–
1p	Ph	–	–
2a	4-NO ₂ Ph	H	H
2b	4-ClPh	H	H
2c	4-NO ₂ Ph	CH ₃	H
2d	4-ClPh	CH ₃	H
2e	Ph	CH ₃	H
2f	4-NO ₂ Ph	H	CH ₃
3a	4-NO ₂ Ph	–	–
3b	4-ClPh	–	–
3c	Ph	–	–
4	4-NO ₂ Ph	–	–
5	4-NO ₂ Ph	–	–
6a	4-NO ₂ Ph	–	–
6b	4-ClPh	–	–
6c	Ph	–	–

Please cite this article as: Bilbao-Ramos P, et al, Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities, Parasitol Int (2012), doi:10.1016/j.parint.2012.05.015

2.2.1.2. Promastigote susceptibility assay. The assay was performed using a modification of a previous method [45]. Promastigotes (2.5×10^5 parasites/well) were cultured in 96-well plastic plates. Compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). Different dilutions of the compounds (a first screening using 1, 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$, and then 252, 126, 63, 31.5, 15.7, 7.8, 3.9, and 1.9 μM for active compounds) up to 200 μL final volume were added. The final solvent (DMSO) concentrations never exceeded 0.1% (v/v) with no effect on the parasites proliferation or morphology. After 48 h at 26 °C, 20 μL of 2.5 mM resazurin solution was added and the fluorescence intensity (535 nm-excitation wavelength- and 590 nm-emission wavelength) was determined with a fluorometer Infinite 200 (Tecan i-Control) to calculate growth inhibition rate (%). All tests were carried out in triplicate. Miltefosine was used as reference drug. The efficacy of each compound was estimated by calculating the IC_{50} (concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites) and GI% (growth inhibitory percentage).

2.2.1.3. Amastigote assay. In the amastigote assay, 10^4 J774 cells/well were cultured in 8-well Lab-Tek chambers (Nunc) using a modification of the method described by Méndez et al. (1996) [48]. Briefly, once macrophages were adhered, 10^5 stationary phase *Leishmania* promastigotes/well were added and maintained at 33 °C in 5% CO_2 overnight. Non-internalized promastigotes were eliminated and dilutions of compounds were added for 48 h. Slides were fixed and stained (Giemsa) and the number of amastigotes/100 cells was determined. Cultures were performed at least in triplicate.

2.2.2. In vitro trypanocidal assays

2.2.2.1. Parasites and culture procedure. For *in vitro* studies, the clone CL-B5 of *T. cruzi* was used. The parasites, stably transfected with the *Escherichia coli* β -galactosidase gene (*lacZ*), were kindly provided by Dr. F. Buckner through University Complutense of Madrid (Spain). The epimastigotes were grown at 28 °C in liver infusion tryptose broth (LIT) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL of penicillin plus 100 $\mu\text{g/mL}$ of streptomycin and harvested during the exponential phase of growth.

2.2.2.2. Epimastigote susceptibility assay. The screening assay was performed in 96-well microplates (Sarstedt, Sarstedt, Inc.) with cultures that had not reached the stationary phase as described [49]. Briefly, epimastigotes were seeded at 1×10^5 per milliliter in 200 μL . The plates were then incubated with the compounds at 28 °C for 72 h, at which time 50 μL of the substrate solution, chlorophenol red beta-D-galactopyranoside (CPRG) was added to give a final concentration of 200 μM . The plates were incubated at 37 °C for an additional 6 h and were then read at 595 nm. Benznidazole was used as reference drug. Each concentration was tested in triplicate. Each experiment was performed twice separately. The efficacy of each compound was estimated by calculating the IC_{50} and GI%.

2.3. Cytotoxicity assay

2.3.1. Cells

J774 murine macrophages were grown in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (30 min at 56 °C), penicillin G (100 U/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$). For the experiments, cells in the pre-confluence phase were harvested with trypsin. Cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified environment with 5% CO_2 .

2.3.2. Cytotoxicity assay on macrophages

Cell viability was evaluated using a modification of a colorimetric method described previously [45]. J774 macrophages were seeded (5×10^4 cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 200 μL of RPMI-1640 medium. The cells were allowed to adhere for 24 h at 37 °C in 5% CO_2 , then the medium was replaced by different concentrations of the test compounds in 200 μL of medium, and exposed for another 24 h. Growth controls were also included. To evaluate cell viability, 20 μL of a 2.5 mM resazurin solution was added and the plates were returned to the incubator for another 3 h. The reduction of resazurin was determined by measurement of the fluorescence intensity (535 nm-excitation wavelength and 590 nm-emission wavelength). Each concentration was assayed three times. Medium and controls were used in each test as blanks. Cytotoxicity effect of compounds was defined as the 50% reduction of cell viability of treated culture cells with respect to untreated culture (CC_{50}).

Table 2
Effect of sulfonamides 1–6 on *Leishmania* spp., *T. cruzi* and J774 macrophages.^{a,b,c}

Compd	<i>L. infantum</i> ^d		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. guyanensis</i>		<i>L. amazonensis</i>		<i>T. cruzi</i>		J774
	GI (%)	IC_{50} (μM)	GI (%)	IC_{50} (μM)	GI (%)	IC_{50} (μM)	GI (%)	IC_{50} (μM)	GI (%)	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
1a	92.7	76.4	94	48.8	99	46.4	98	68.6	87.1	156.1	> 256
1i	72.7	223.1	81.9	247.5	67	ND	31	ND	39.7	ND	> 256
1j	71.5	216	79.6	223.3	81	110	87	214.6	ND	ND	> 256
1n	90.8	66.2	84.3	61.5	94	84.2	30	ND	84.7	76.14	> 256
2a	58.6	ND	81.1	93.5	87	169	54	ND	32.6	ND	> 256
2b	65.0	175.1	73.2	139.4	87	169.2	62	ND	ND	ND	> 256
2d	71	29.1	81	1.5	63	33.2	74.2	5	51	ND	> 256
2e	84.4	112.9	91.9	147.5	91	108.4	41	ND	31.8	ND	> 256
4	53	ND	73	ND	84	83.4	83	163.6	79	58.3	> 256
5	98	61.3	89	80.8	94	139.6	97.9	66.7	58	ND	132.9
6a	91.9	3.14	84.4	55.9	76	39	90	11.4	100	35.6	61
6b	96	6.8	82	22	96	1.9	100	18	90.2	76.1	94
6c	45.3	ND	73.1	ND	57	ND	53	ND	61.5	ND	ND
M	93	7.2	95	3.1	98	18.2	98	9.6	—	—	135.9
B	—	—	—	—	—	—	—	—	90.3	54.7	> 256

^a ND, not determined.

^b GI (%), growth inhibitory percentage; IC_{50} , concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites; CC_{50} , concentration of the compound that produced a 50% reduction of cell viability of treated culture cells with respect to untreated culture.

^c M: miltefosine, B: benznidazole.

^d Data for *L. infantum* published in Ref. [45].

Please cite this article as: Bilbao-Ramos P, et al, Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities, Parasitol Int (2012), doi:10.1016/j.parint.2012.05.015

2.4. Nuclease activity: pUC18 DNA cleavage

Reactions were undertaken by mixing 7 μ L of 0.1 M cacodylate buffer (pH 6.0), 1 μ L of pUC18 (0.25 μ g/ μ L), 6 μ L of a solution of the tested compound at increasing concentrations to obtain final concentrations of 30 μ M and 60 μ M and 6 μ L of ascorbic acid in cacodylate buffer. The mixtures were allowed to stand for 60 min at 37 °C. After that, 3 μ L of a loading buffer solution consisting of 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol and 30% glycerol was added. Then, the solution was subjected to electrophoresis on a 0.8% agarose gel in 0.5 \times TBE buffer (0.045 M Tris, 0.045 M boric acid and 1 mM EDTA) containing 2 μ L/100 mL of a solution of ethidium bromide (10 mg/mL) at 80 V for about 2 h. The gel was photographed on a capturing gel printer plus TDI.

To test for the presence of reactive oxygen species (ROS) generated during strand scission, reactive oxygen intermediate scavengers were added alternatively to the reaction mixtures. These scavengers were DMSO (1 M), *tert*-butyl alcohol (1 M), 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (100 mM), tiron (10 mM) and SOD (superoxide dismutase, 15 units). Assays in presence of the minor groove binder distamycin (8 μ M), the major groove binder methyl green (2.5 μ L of a 0.01 mg/mL solution) or the stabilizer of CuI forms (neocuproine 1 mM) were also performed. Samples were treated as described above.

2.5. Transmission and scanning electron microscopy

Promastigotes of *L. infantum* previously treated for 48 h with compounds **1a**, **1n** and **2d** at corresponding concentrations (IC₉₀ 52, 100, 100 μ g/mL respectively) and at a density of 1×10^6 cells/mL in a Schneider's medium, were centrifuged at 2500 g for 5 min, washed two times in Millonig buffer 0.1 M supplied with 0.54% glucose (pH 7.2) and then, for both scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy the pellet were fixed with 2.5% glutaraldehyde in Millonig buffer 0.1 M (pH 7.2) for 90 min at 26 °C. Pellets were centrifuged at 2500 g and separated for SEM and TEM following the technique as described [50,51]. Briefly, for SEM the pellets were fully dehydrated in a graded ethanol and acetone series, dried in a Poloron Critical Point Dryer, mounted on stubs coated with Au–Pd alloy (500 Å thickness) and viewed in a Zeiss DSM-950 digital scanning microscope at 20 kV. For TEM the Millonig buffer was eliminated and promastigotes were embedded in agar 2%, then blocks of agar were post-fixed for 1.5 h with 1% OsO₄, rinsed in distilled water and then dehydrated in a graded acetone series. After full dehydration, agar blocks were embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate (1%) and Reynolds's lead citrate, finally they were examined in an EM-10 Zeiss microscope at 80 kV.

2.6. Statistics

All data for each experiment were analyzed by the ANOVA one way and Tukey's HSD test. Statistical significance was considered when p was ≤ 0.05 . The efficacy against parasite (IC₅₀) and cytotoxicity effect (CC₅₀) of compounds were determined from Probit analysis using SPSS v15.0 software.

3. Results and discussion

3.1. Anti-leishmanial and trypanocidal effects

Previous results from our group showed that a series of sulfonamides **1–6** (Table 1) presented an interesting anti-leishmanial profile against *L. infantum*, including derivatives **1a** and **1n** that displayed significant *in vivo* activity. In the present work, the *in vitro* anti-leishmanial activities of compounds **1–6** have been also investigated against cultured promastigotes of *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and *L. amazonensis*, using a standard assay [45]. Compounds **1–6** were also evaluated against *T. cruzi*

epimastigotes. The inhibition of *T. cruzi* epimastigote proliferation was determined against *T. cruzi* laboratory strain (clone CL-B5) cultured under standard conditions, according to a literature protocol [49]. Reduction of epimastigote growth rate was established after 72 h treatment in comparison with benznidazole. Viability of the cells was determined by a fluorometric method with resazurin previously described [45]. Table 2 shows the leishmanicidal and trypanocidal activities as well as the cytotoxicity on J774 macrophages of sulfonamides **1–6** that presented interesting anti-protozoal activity. We can observe that compounds **1a**, **2d**, **5**, **6a** and **6b** displayed significant *in vitro* activities against the promastigote form of all the investigated *Leishmania* species. Moreover, in the case of compounds **1a** and **2d**, the leishmanicidal activity was associated with a lack of toxicity to murine macrophages (CC₅₀ > 256 μ M).

This study also pointed out to differences among *Leishmania* species and *T. cruzi*. When we compared the activity spectrum of the active and non cytotoxic sulfonamides **1a**, **1n**, **2d** and **4**, by using the statistical method Tukey's HSD test, we could notice that overall, *L. braziliensis* was the most sensible species to this series of sulfonamides ($p < 0.05$).

Moreover, the compounds exhibited different behaviors against *Leishmania* species and *Trypanosoma*. For example, compound **1n** was active against all *Leishmania* species, except for *L. amazonensis*, whereas compound **4** was only moderately active against *L. guyanensis* and *L. amazonensis* ($p < 0.05$). It is interesting to note that none of the tested sulfonamides **1–6** displayed activity exclusively against *T. cruzi* epimastigotes. Only compounds **1n** and **4** effectively inhibited the growth of *T. cruzi* parasites ($p < 0.05$). Apparently, the presence of the pharmacophoric group sulfonamide enhances the anti-leishmanial activity more significantly than the anti-*T. cruzi* effect. It is noteworthy that compounds **1n** and **4** possess the *p*-nitrobenzene moiety, similar to nifurtimox (a nitrofur) and benznidazole (a nitroimidazole), the marketed drugs against Chagas disease, therefore highlighting the importance of the nitro group for the trypanocidal activity (Fig. 1).

In order to assess the anti-amastigote activity an assay was developed where the macrophage-like murine cell line J774 was infected with *L. infantum* and subsequently treated with selected sulfonamides **1a**, **1n** and **2d**. In the experiment the *in vitro* activity against intracellular amastigotes was found to be lower than the reference drug miltefosine, with an IC₅₀ of 88, 79 and 90 μ M for **1a**, **1n** and **2d**, respectively and 21 μ M for miltefosine. However, none of the sulfonamides was toxic at any concentration in comparison to the reference drug, showing a better selective index ratio (CC₅₀ for cells/IC₅₀ for parasite) than miltefosine, whose toxicity was 135.9 μ M.

3.2. Nuclease activity

In a preliminary study carried out by us, it demonstrated the nuclease activity of the sulfonamido pyrimidine derivative **1a** in the presence of Cu(II) [45]. In the present work, we have investigated the nuclease activity of the sulfonamido pyrazine derivative **1n** and sulfonamido sulfathiazolyl derivative **2d**. Moreover, studies on sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** to determine the reactive species responsible for DNA damage have been also carried out.

The activity of compounds **1n** and **2d** as chemical nucleases was studied using supercoiled pUC18 DNA in cacodylate buffer (pH = 6.0).

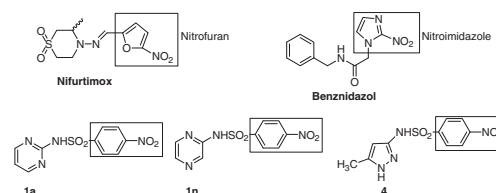


Fig. 1. Nitroderivatives with trypanocidal activities.

DNA cleavage is controlled by relaxation of supercoiled circular form of pUC18 into nicked circular form and linear forms. When circular plasmid DNA is submitted to electrophoresis, the fastest migration is observed for the supercoiled form (Form I). If one strand is cleaved, the supercoils will relax to produce a slower-moving open circular form (Form II). If both strands are cleaved, a linear form (Form III) will be generated that migrates at an intermediate speed.

An inspection of Fig. 2 shows that sulfonamides **1n** and **2d** do not present ability to damage plasmid DNA at the assayed concentrations. Nevertheless, considering that we have previously shown the nuclease activity of sulfonamide **1a** in the presence of Cu(II), further assays were carried out to evaluate the ability to cleave pUC18 plasmid DNA by copper(II)–ligand (1:1) mixtures of sulfonamides **1n** and **2d**. The nuclease activity by the copper(II)–ligand mixtures of sulfonamides **1n** and **2d** was examined at 15 μ M or 45 μ M and compared with that of the Cu(II) chloride in the presence of the reducing agent ascorbate (50-fold excess relative copper(II) concentration) (Fig. 3).

As shown in Fig. 3, Cu(II)–ligand **1n** (1:1) mixture at 15 μ M was able to cleave a fraction of supercoiled DNA into circular and linear forms (lane 5). At the concentration of 45 μ M a complete degradation of supercoiled form to yield circular and linear forms was observed (lane 6). The nuclease activity showed by Cu(II)–ligand **2d** (1:1) was a bit lower. When the Cu(II)–ligand **2d** (1:1) mixture concentration was 15 μ M, a little quantity of supercoiled DNA is cleaved into circular form (lane 7). With a concentration of 45 μ M, DNA cleavage increases and the three DNA forms coexist (lane 8). The activity of both mixtures **1n** and **2d** was higher than that of copper(II) salt at the same conditions (compare lanes 6 and 8 with lane 4). Taking into consideration that sulfonamides **1n** and **2d** do not exhibit nuclease activity alone and Cu(II)–**1n** (1:1) and Cu(II)–**2d** (1:1) mixtures were able to cleave DNA, it is evident that Cu(II) does contribute to the DNA cleavage process. As a consequence, compounds **1n** and **2d** can be considered as nuclease agents in the presence of copper(II) and ascorbic acid, analogous to sulfonamide **1a**. Due to Cu(II) and the compounds did not show any nuclease activity by themselves at the experimental conditions, the DNA cleavage produced by the mixtures may arise from the complexation of Cu(II) with the compounds. It is well known that Cu(II) complexes can act as chemical nucleases.

Transition metal ions such as copper(II) are present at low levels in biological systems and these conditions can be found easily inside the cell. Therefore, the behavior of compounds **1a**, **1n** and **2d** is probably due to the involvement of a redox process in the presence of the metal transition Cu(II), which produces the generation of active oxygen species that are directly responsible for the DNA cleavage reaction [52]. Transition metal complexes utilize the redox properties of the metal and dioxygen (O_2). This is the first step to the activation of a cascade of reactions that produces the generation of reactive oxygen species (hydroxyl, superoxide and singlet oxygen-like species) which then cleave the DNA [52]. Subsequently, studies to identify the reactive oxygen species (ROS) that mediate the DNA strand scission of copper(II)–ligand (1:1) mixtures of sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** were carried out. We investigated the formation of three activated oxygen intermediates: hydroxyl radical (OH^\bullet), singlet oxygen (1O_2) and superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) by monitoring the quenching of DNA

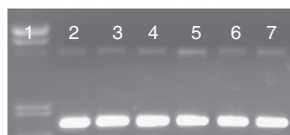


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA treated with compounds **1n**, **2d** and ascorbic acid. Incubation time 60 min (37 °C). 1: λ DNA/EcoRI + HindIII Marker; 2: pUC18 plasmid; 3: control (pUC18 + ascorbic acid); 4: **1n** 30 μ M; 5: **1n** 60 μ M; 6: **2d** 30 μ M; 7: **2d** 60 μ M.

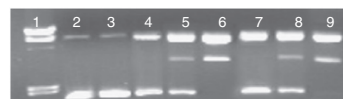


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA treated with the mixture of copper chloride and compounds **1n**, **2d** and 50 fold-excess of ascorbate. Incubation time: 60 min (37 °C). 1: λ DNA/EcoRI + HindIII Marker; 2: control; 3: pUC18 + ascorbate; 4: $CuCl_2$ 45 μ M; 5: **1n** 15 μ M; 6: **1n** 45 μ M; 7: **2d** 15 μ M; 8: **2d** 45 μ M; 9: $Cu(phen)_2$ 15 μ M.

cleavage in the presence of ROS scavengers in solution. Fig. 4 shows the influence of the radical scavengers on the DNA cleavage of the copper(II)–ligand (1:1) mixtures of **1a** (Fig. 4a), **1n** (Fig. 4b) and **2d** (Fig. 4c).

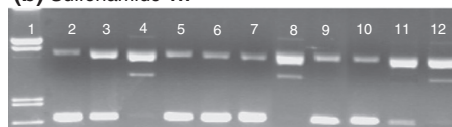
It can be found that the hydroxyl radical scavengers, DMSO and *tert*-butyl alcohol added to the mixtures inhibit the DNA cleavage indicating the formation of hydroxyl radical as one of the reactive species (lanes 5 and 6 in Fig. 4). The involvement of singlet oxygen-like species can be deduced from the inhibition of the DNA scission in presence of 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (lanes 7, Fig. 4). Tiron, a typical scavenger of superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), inhibits DNA damage produced by the mixtures suggesting that superoxide radical is involved into the DNA cleavage (lanes 9, Fig. 4).

It is interesting to note the different behavior shown by copper(II)–**1a** (1:1) or copper(II)–**2d** (1:1) mixtures with respect to copper(II)–**1n** (1:1) mixture by the addition of the superoxide-scavenging enzyme, superoxide dismutase (SOD) (lane 8, Fig. 4). A significant inhibition of the DNA cleavage was observed in the case of the copper(II)–**1a** (1:1) and copper(II)–**2d** (1:1) mixtures, indicating that superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) is one of the ROS responsible for DNA breakage. However, SOD addition did not have any apparent effect on the DNA cleavage mediated by copper(II)–**1n** (1:1) mixture [53]. This result possibly could explain the different behavior of the

(a) Sulfonamide **1a**



(b) Sulfonamide **1n**



(c) Sulfonamide **2d**



Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA treated with 45 μ M of compounds **1a** (a), **1n** (b) and **2d** (c) in the presence of ascorbate acid and potential inhibitor agents. Incubation time 1 h (37 °C). Lane 1: λ DNA/EcoRI + HindIII Marker; lane 2: supercoiled DNA (control); lane 3: pUC18 + ascorbate; lane 4: compound; lane 5: compound + DMSO (1 M); lane 6: compound + *tert*-butyl alcohol (1 M); lane 7: compound + 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (100 mM); lane 8: compound + SOD (15 units); lane 9: compound + tiron (0.4 M); lane 10: compound + neocuproine (1 mM); lane 11: compound + distamycin (8 μ M); lane 12: compound + methyl green (0.00125 mg/mL).

Please cite this article as: Bilbao-Ramos P, et al, Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities, Parasitol Int (2012), doi:10.1016/j.parint.2012.05.015

sulfonamide **1n** against *L. amazonensis* in comparison to sulfonamides **1a** and **2d** (Table 2).

Reoxidation of Cu(I) to Cu(II) is known to generate superoxide radicals. To investigate the involvement of Cu(I) in the DNA damage, the quenching of DNA cleavage was studied in the presence of neocuproine, a Cu(I)-specific chelating agent that forms strong complexes with Cu(I). The addition of neocuproine does inhibit DNA cleavage produced by the three mixtures (lane 10, Fig. 4). Therefore, the suppression of DNA cleavage by the addition of the specific Cu(I) chelator neocuproine suggests the implication of Cu(I) in DNA damage.

To determine the DNA groove selectivity of copper(II)–ligand **1a** (1:1), copper(II)–ligand **1n** (1:1) and copper(II)–ligand **2d** (1:1) mixtures, control experiments have been performed using minor groove binder distamycin and major groove binder methyl green. The results indicate that the addition of distamycin or methyl green significantly

decreases the breakage of DNA strands produced by copper(II)–ligand **1a** (1:1) and copper(II)–ligand **2d** (1:1) mixtures, however, the cleavage produced by copper(II)–ligand **1n** (1:1) mixture is only inhibited in the presence of distamycin, but not by methyl green. As a first approach, it could be inferred from these results that compound **1n** might prefer minor groove binding and sulfonamides **1a** and **2d** could bind to DNA via the minor and major grooves. These results could again help to support the different behavior of the sulfonamide **1n** against *L. amazonensis* in comparison to sulfonamides **1a** and **2d**.

As regard to the mechanistic pathway involved in the DNA cleavage reaction, our results suggest that the first step could be the interaction of copper(II)–ligand (1:1) mixtures of sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** with DNA through the minor and/or major groove. The second step of the proposed mechanism consists on the reduction of copper(II) complex to copper(I) complex through the reaction with the reducing

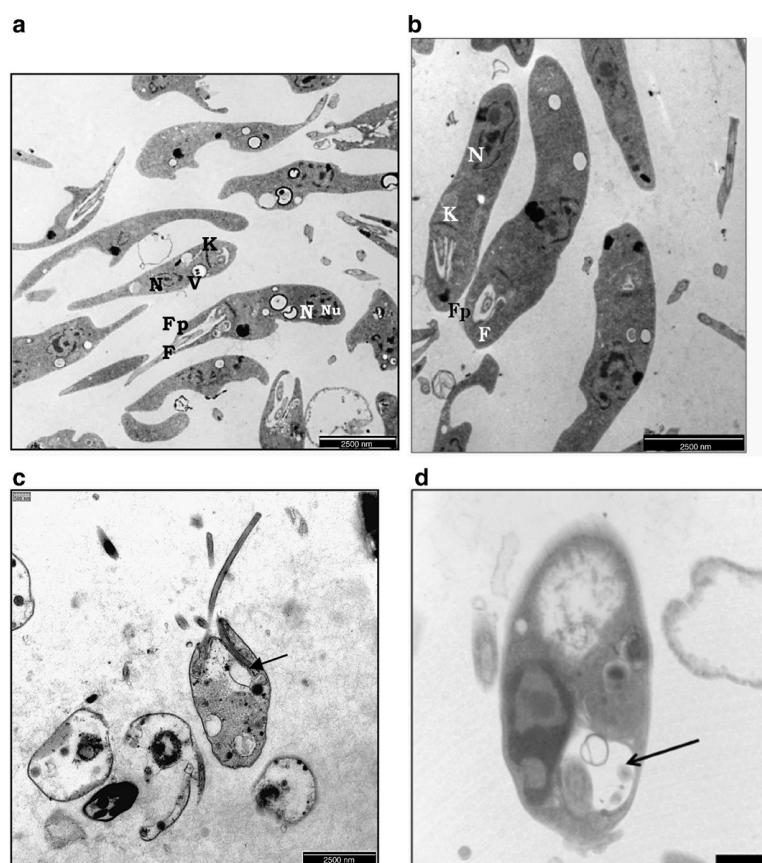


Fig. 5. Ultrastructural alterations on *L. infantum* promastigotes, induced by treatment with sulfonamides **1a**, **1n** and **2d**. (a, b) General view of untreated promastigotes which present a normal ultrastructure of organelles such as nucleus (N) with its nucleolus (Nu), kinetoplast (K) as a prolongation of mitochondria (M), flagellar pocket (Fp), flagella (F) and vacuoles (V). (c, d) Parasite treated with compound **1a** showing cellular membrane damage and drastic alterations in nucleus, mitochondria and kinetoplast together with severe changes in the flagellar pocket (black arrow). (e, f) After treatment with compound **1n**, it is possible to observe severe cellular disorganization with marked mitochondrial and kinetoplast degradation together with an increased number of acidocalcisomes (white arrow). Some parasites exhibited signs of abnormal developmental effects such as the presence of two or three flagella (black arrow). (g, h) Parasites treated with compound **2d** presented drastic internal disorganization with the appearance of lamellar residues (white arrow) and electron-dense bodies (black arrow).

Please cite this article as: Bilbao-Ramos P, et al, Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities, Parasitol Int (2012), doi:10.1016/j.parint.2012.05.015

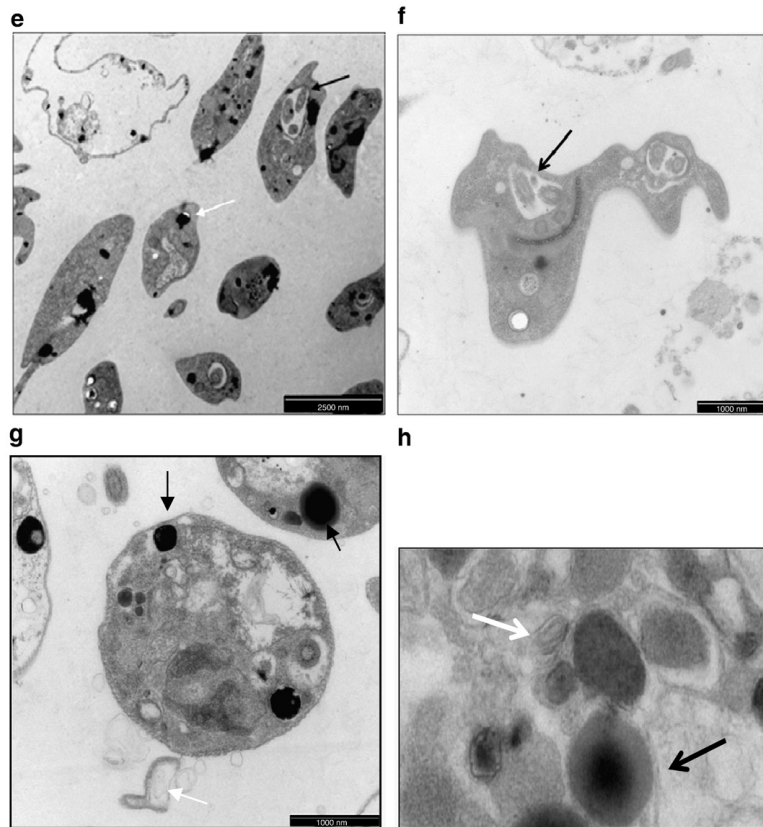


Fig. 5 (continued).

agent ascorbate. This proposal is possible into the parasitic cells because both, copper(II) ions and other metal ions capable to catalyze the redox reaction such as Fe(III) or Mn(VII), and reducing agents (as ascorbate, glutathione, polyphenols, tocopherols and so on) are present in biological systems. Once copper(I) complex would be formed a metal-catalyzed reaction could activate a cascade of reactions that eventually would generate the reactive oxygen species $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, and $^1\text{O}_2$ [54]. These species would be responsible for initiating the DNA strand scission chemistry [55].

Therefore, our findings provide evidence that the oxidative cleavage is probably produced by formation of redox active Cu(I) complexes with DNA, with subsequent generation of reactive oxygen species that produce DNA scission.

3.3. Ultrastructural effects

TEM analyses of untreated and treated promastigotes of *L. infantum* log phase were performed to evidence the morphological changes and alterations caused by sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** (Fig. 5). Untreated *L. infantum* promastigotes showed a classical ultrastructure of kinetoplastids. A nucleus (N) with its nucleolus (Nu) and the characteristic microtubules (Mt), the kinetoplast (K) appearing as a prolongation of the mitochondria (M), a flagellar pocket (FP), flagella (F) and

vacuoles (V) (Fig. 5a, b). In contrast *L. infantum* promastigotes treated with sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** displayed different degrees of damage. Whereas compounds **1a** and **1n** apparently produced significant alterations mainly addressed to the nucleus, mitochondria and kinetoplast, in the case of compound **2d** a generalized cytoplasmic disorganization was observed as well as damage on kinetoplast, the mitochondria and nucleus. As shown in Fig. 5c and d compound **1a** produced marked disruption effects on mitochondria, kinetoplast and flagellar pocket. Double nuclear membrane was not visible with loss of some cytoplasmic inclusions and cellular border. Moreover, several empty vacuoles and conspicuous electron dense particles were observed. Treatment with compound **1n** (Fig. 5e and f) also caused severe cellular disorganization with notorious changes in cytoplasmic organelles, such as an intense mitochondrial swelling with loss of matrix material and alteration in kinetoplasts. In addition, disruption of nuclear membrane and chromatin was observed. Other modifications included lipid droplets and significant increases in the number of acidocalcisomes. Interestingly some parasites exhibited signs of abnormal development like the presence of two or three flagella suggesting a possible effect of the compound on cytokinesis. Moreover, high accumulation of electron dense bodies in the cytoplasm was often observed. Ultrastructural analysis of the treated parasites with compound **2d** revealed general intracytoplasmic and nuclear disorganization together with the appearance of lamellar (cell

Table 3Summary of damage on *L. infantum* promastigotes observed by transmission electron microscopy, after 48-h exposure to compounds **1a**, **1n** and **2d**.

Structure	Damage (%) ^{a,b}			
	1a	1n	2d	Untreated
Nucleus	17	56	79	11
Nuclear membrane	38	38	75	14
Kinetoplast	44	36	60	0
Plasmatic membrane	33	50	30	15
Flagellum	0	67	100	0
Flagellar pocket	71	75	0	0
Mitochondrion	78	80	33	18

^a For each compound, 50 parasites were analyzed.^b Damage frequency: 0% = no damage; 100% maximum damage.

membrane residues) and electrodense bodies (Fig. 5g, h). A summary of the damage observed by TEM on *L. infantum* promastigotes is shown in Table 3, expressed as percentage.

Regarding SEM analysis, untreated parasites displayed normal morphology and surface topology whereas promastigotes treated with sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** showed dramatic changes in their structure. Parasites treated with compound **1a** were bizarrely shaped cells, whereas those treated with compound **1n** showed a retracted plasmatic membrane. Parasites treated with derivative **2d** displayed a pronounced shrinkage of the cell body (Fig. 6).

4. Conclusions

Thirty sulfonamides previously investigated as anti-*L. infantum* compounds were *in vitro* tested against promastigotes of three *Leishmania* species (*L. braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. guyanensis*), and twenty three of them were also tested on epimastigotes of *T. cruzi*. Selected sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** were also investigated against intracellular *L. infantum* amastigotes. Our findings show that the efficacy of compound **1a**, previously seen in visceral leishmaniasis in a murine model caused by *L. infantum*, extends to *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and

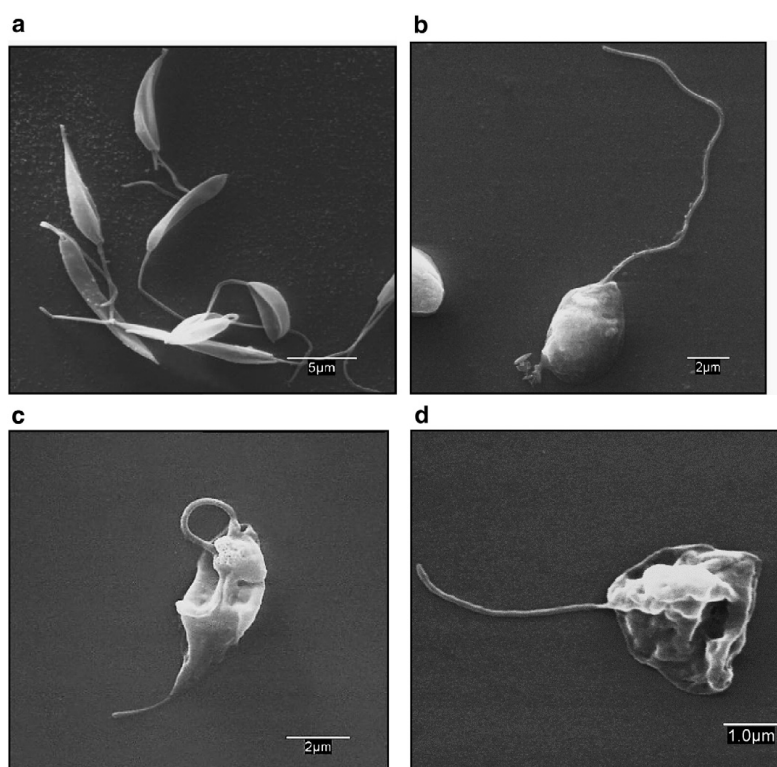


Fig. 6. Scanning electron microscope image of *L. infantum* promastigotes. (a) Control. (b) Parasite treated with compound **1a**. (c) Treated with compound **1n**. (d) Treated with compound **2d**.

Please cite this article as: Bilbao-Ramos P, et al, Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities, Parasitol Int (2012), doi:10.1016/j.parint.2012.05.015

L. amazonensis. These results reveal that sulfonamide **1a** is a promising compound as prototype for treating leishmaniasis, as it affects species of *Leishmania* responsible of different clinical manifestations. This study also pointed out to differences between the *Leishmania* species.

Nuclease activity studies carried out on the interaction of sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** with plasmid DNA showed an oxidative cleavage probably produced by formation of redox active metal complexes that generate ROS responsible for DNA scission. In addition, electron microscopy analysis showed ultrastructural effects mainly addressed to DNA bearing structures such as nucleus, mitochondria and kinetoplast. Taken together the results from nuclease assays and from electron microscopy studies, it can be considered that DNA is likely to be the main target. Nevertheless it cannot be discarded that the observed morphological changes could precede the DNA degradation as an effect of the sulfonamides on parasite-specific molecular machineries or uptake.

In summary, our data provide further information regarding the activity of sulfonamides **1–6** upon *T. cruzi* and *Leishmania* spp. which should aid future design and synthesis of agents that could be used for antiparasitic therapy. *In vivo* and *in vitro* preformulation studies to provide the basis for the clinical development are going on.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselleria de Sanitat-Generalitat Valenciana (Projects AP-116/09, AP158/10), the University CEU-Cardenal Herrera (Project PRCEU-UCH09-19) and Spanish Agency for International Cooperation and Development (AECID) A-024457/09. P. Bilbao is thankful to the MAEC-AECID for a PhD fellowship. The authors also wish to thank to UAH Microscopy Facility.

References

- Nussbaum K, Honke J, Cadmus CM, Efferth T. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. *Current Medicinal Chemistry* 2010;17:1594–617.
- <http://www.who.int/topics/en> 30 Dec 2011, date last accessed.
- <http://www.dndi.org> 30 Dec 2011, date last accessed.
- Graebn CS, Uchoa FD, Bernardes LSC, Campo VL, Carvalho I, Eifler-Lima VL. Anti-protozoal agents: an overview. *Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry* 2009;8:345–66.
- Croft SL. Kinetoplastida new therapeutic strategies. *Parasite* 2008;15:522–7.
- Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Andrews PC, Junk PC, Kedzierska K. *Leishmaniasis*: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Current Medicinal Chemistry* 2009;16:599–614.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in *Leishmaniasis*. *Clinical Microbiology Reviews* 2006;19:111–26.
- Filardi LS, Brenner Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1987;81:755–9.
- Richard JV, Werbovetz KA. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Current Opinion in Chemical Biology* 2010;14:447–55.
- Cerecetto H, González M. Synthetic medicinal chemistry in Chagas' disease: compounds at the final stage of "hit-to-lead" phase. *Pharmaceuticals* 2010;3:810–38.
- Argyropoulou I, Geronikaki A, Vicini P, Zani F. Synthesis and biological evaluation of sulfonamide thiazole and benzothiazole derivatives as antimicrobial agents. *Arxiv* 2009;6:89–102.
- Mitscher LA, Lemke TL, Gentry EJ. Antibiotics and antimicrobial agents. In: Lemke TL, Williams DA, editors. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2008. p. 1028–83.
- Vullo D, Innocenti A, Supuran CT. Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory activity: toward novel applications for sulfonamide drugs. In: Supuran CT, Winum J-Y, editors. *Drug design of zinc-enzyme inhibitors*. New Jersey: John Wiley and Sons; 2009. p. 155–70.
- Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2000;10:575–600.
- Navarrete-Vazquez G, Paoli P, León-Rivera I, Villalobos-Molina R, Medina-Franco JL, Ortiz-Andrade R, Estrada-Soto S, Camini G, Diaz-Coutinho D, Gallardo-Ortiz I, Martínez-Mayorga K, Moreno-Díaz H. Synthesis, *in vitro* and computational studies of protein tyrosine phosphatase 1B inhibition of a small library of 2-arylsulfonamides with antihyperglycemic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009;17:3332–41.
- Selam JL. Pharmacokinetics of hypoglycemic sulfonamides: Ozidia, a new concept. *Diabetes & Metabolism* 1997;23:39–43.
- Thorner CW. Isosterism and molecular modification in drug design. *Chemical Society Reviews* 1979;8:563–80.
- Ghorab M, Ragab A, Hamed MM. Design, synthesis and anticancer evaluation of novel tetrahydroquinoline derivatives containing sulfonamide moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009;44:4211–7.
- Hu L, Li Z, Jiang JD, Boykin DW. Novel diaryl or heterocyclic sulfonamides as anti-mitotic agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2008;8:739–45.
- Rostom SAF. Synthesis and *in vitro* antitumor evaluation of some indeno [1,2-c] pyrazol(in)es substituted with sulfonamide, sulfonylurea(-thiourea) pharmacophores, and some derived thiazole ring systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006;14:6475–85.
- Supuran CT, Casini A, Mastrolorenzo A, Scozzafava A. COX-2 selective inhibitors, carbonic anhydrase inhibition and anticancer properties of sulfonamides belonging to this class of pharmacological agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2004;4:625–32.
- Wolfe C, Hicks C. Profile of darunavir in the management of treatment-experienced HIV patient. *HIV/AIDS: Research and Palliative Care* 2009;1:13–21.
- Stranix BR, Lavallée JF, Sevigny G, Yelle J, Perron V, LeBerre N, Herbart D, Wu JJ. Lysine sulfonamides as novel HIV-protease inhibitors: N-acyl aromatic α -amino acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006;16:3459–62.
- Supuran CT, Innocenti A, Mastrolorenzo A, Scozzafava A. Antiviral sulfonamide derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2004;4:189–200.
- Martyn DC, Cortese JF, Tyndall E, Dick J, Mazitschek R, Munoz B, Clardy J. Antiplasmodial activity of piperazine sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010;20:218–21.
- Hernández-Núñez E, Tlahuext H, Moo-Puc R, Torres-Gómez H, Reyes-Martínez R, Cedillo-Rivera R, Nava-Zuazo C, Navarrete-Vazquez G. Synthesis and *in vitro* trichomonocidal, giardicidal and amebicidal activity of N-acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1H-imidazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009;44:2975–84.
- Ekoue-Kovi K, Yearick K, Iwaniuk DP, Natarajan JK, Alumsa J, de Dios AC, Roepe PD, Wolf C. Synthesis and antimalarial activity of new 4-amino-7-chloroquinolyl amides, sulfonamides, ureas and thioureas. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009;17:270–83.
- Parai MK, Panda G, Srivastava K, Puri SK. Design, synthesis and antimalarial activity of benzene and isoquinoline sulfonamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008;18:776–8.
- Krungskrai J, Krungskrai SR, Supuran CT. Malarial parasite carbonic anhydrase and its inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2007;7:909–17.
- Domínguez JN, León C, Rodríguez J, Gamboa de Domínguez N, Gut J, Ph Rosenthal. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. *Il Farmaco* 2005;60:307–11.
- Norose K, Asoai F, Mun HS, Yano A. Effects of sulfamethoxazole on murine ocular toxoplasmosis in interferon- γ knockout mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47:265–71.
- Greif G, Harder A, Heberkorn A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: Coccidia –current level of knowledge and outlook. *Parasitology Research* 2001;87:973–5.
- van der Ven AJ, de Ven EM, Schoondermark-van, Camps W, Melchers WJ, Koopmans PP, van der Meer JW, Galama JM. Anti-Toxoplasma effect of pyrimethamine, trimethoprim and sulfonamides alone and in combination: implications for therapy. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996;38:75–80.
- Pagliaro RJ, Lusvardi S, Pierini AB, Brun R, Mazzieri MR. Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010;18:142–50.
- Goodarzi M, da Cunha EF, Freitas MP, Ramalho TC. QSAR and docking studies of novel antileishmanial diaryl sulfides and sulfonamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010;45:4879–89.
- da Silva LE, de Sousa PT, Jr Maciel EN, Korting-Nunes R, Eger I, Steindel M, Andrade-Rebello R. *In vitro* antiparasitic evaluation of zinc and copper complexes based on sulfonamides containing 8-aminoquinoline ligands. *Letters in Drug Design & Discovery* 2010;7:679–85.
- Souza AM, Castro HC, Brito MA, Andrighetti-Fröner CR, Magalhães U, Oliveira KN, Gaspar-Silva D, Pacheco LK, Joussef AC, Steindel M, Simoes CM, Santos DO, Albuquerque MG, Rodrigues CR, Nunes RJ. *Leishmania amazonensis* growth inhibitors: biological and theoretical features of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives. *Current Microbiology* 2009;59:374–9.
- Khan KM, Khan MZ, Taha M, Maharvi GM, Saify ZS, Parveen S, Choudhary ML. Leishmanicidal potential of N-substituted morpholine derivatives: synthesis and structure-activity relationships. *Natural Product Research* 2009;23:479–84.
- Altenkämper M, Bechem B, Perruchon J, Heinrich S, Madel A, Ortmann R, Dahse HM, Freunschütz E, Wang Y, Rath J, Stich A, Hitzler M, Chiba P, Lanzer M, Schlitzer M. Antimalarial and antitrypanosomal activity of a series of amide and sulfonamide derivatives of a 2,5-diaminobenzophenone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009;17:7690–7.
- da Silva LE, Joussef AC, Pacheco LK, da Silva DG, Steindel M, Rebello RA, Schmidt B. Synthesis and *in vitro* evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of N-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007;15:7553–60.
- Ajibade PA, Kolawole GA, Brien PO. Metal complexes of 4-amino-N-(2-pyrimidinyl) benzene sulfonamide: synthesis, characterization and antiparasitic studies. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry* 2007;37:653–9.
- George TG, Endeshaw MM, Morgan RE, Mahasenan KV, Delfin DA, Mukherjee MS, Yakovich AJ, Fotie J, Li C, Werbovetz KA. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 3,5-substituted-N1-phenyl-N4, N4-di-n-butylsulfanilamides as antikinetoplastid antimitotic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007;15:6071–9.

Please cite this article as: Bilbao-Ramos P, et al, Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities, *Parasitol Int* (2012), doi:10.1016/j.parint.2012.05.015

- [43] Bhattacharya G, Herman J, Delfin DA, Salem MM, Barszcz T, Mollet M, Riccio G, Brun R, Werbovetz KA. Synthesis and antitubulin activity of N^1 - and N^4 -substituted 3,5-dinitro sulfanilamides against African trypanosomes and *Leishmania*. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004;47:1823–32.
- [44] Chibale K, Haupt H, Kendrick H, Yardley V, Saravanamuthu A, Fairlamb AH, Croft SL. Antiprotozoal and cytotoxicity evaluation of sulfonamide and urea analogues of quinacrine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001;11:2655–7.
- [45] Dea-Ayuela MA, Castillo E, González-Álvarez M, Vega C, Rolón M, Bolás-Fernández F, Borrás J, González-Rosende ME. *In vivo* and *in vitro* anti-leishmanial activities of 4-nitro-*N*-pyrimidin-2-ylbenzenesulfonamide and N^2 -(4-nitrophenyl)- N^1 -propylglycinamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009;17:7449–56.
- [46] Ameen M. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2010;11:557–69.
- [47] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> 30 Dec 2011, date last accessed.
- [48] Méndez S, Nell M, Alunda JM. *Leishmania infantum*: infection of macrophages *in vitro* with promastigotes. *International Journal of Parasitology* 1996;26:619–22.
- [49] Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JA, Gómez-Barrio A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. *Parasitology Research* 2005;95:296–8.
- [50] Pérez-Serrano J, Grosman C, Urrea-París MA, Denegri G, Casado N, Rodríguez-Cabeiro F. Depolarization of the tegument precedes morphological alterations in *Echinococcus granulosus* protoscoleces incubated with ivermectin. *Parasitology Research* 2001;87:804–7.
- [51] Muelas-Serrano S, Pérez-Serrano J, Gómez-Barrio A, Arán VJ, Rodríguez-Cabeiro F. Ultrastructural alterations induced by nifurtimox and another nitro derivative on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 2002;88:97–101.
- [52] Drevensek P, Zupancic T, Pihlar B, Jerala R, Kolitsch U, Plaper A, Turel I. Mixed-valence Cu(II)/Cu(I) complex of quinolone ciprofloxacin isolated by a hydrothermal reaction in the presence of L-histidine: comparison of biological activities of various copper-ciprofloxacin compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2005;99:432–42.
- [53] González-Álvarez M, Alzuet G, Borrás J, Pitié M, Meunier B. DNA cleavage studies of mononuclear and dinuclear copper(II) complexes with benzothiazolesulfonamide ligands. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2003;8:644–52.
- [54] Kehrer JP. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149:43–50.
- [55] Sigman DS. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline–copper ion. *Accounts of Chemical Research* 1986;19:180–6.

In Vitro and in Vivo Antileishmanial and Trypanocidal Studies of New *N*-Benzene- and *N*-Naphthalenesulfonamide Derivatives

Cristina Galiana-Roselló,^{†,||} Pablo Bilbao-Ramos,[‡] M. Auxiliadora Dea-Ayuela,^{†,‡} Miriam Rolón,[§] Celeste Vega,[§] Francisco Bolás-Fernández,[‡] Enrique García-España,^{||} Jorge Alfonso,[§] Cathia Coronel,[§] and M. Eugenia González-Rosende^{*,†}

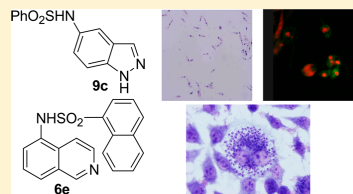
[†]Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Edificio Seminario s/n, 46113-Moncada, Valencia, Spain

[‡]Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040-Madrid, Spain

[§]Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Pai Perez 265 c/Mariscal Estigarribia, 1541-Asunción, Paraguay

^{||}Departamento de Química Inorgánica, ICMOL, Universitat de València, C/Catedrático José Beltrán 2, 46980-Paterna, Spain

ABSTRACT: We report in vivo and in vitro antileishmanial and trypanocidal activities of a new series of *N*-substituted benzene and naphthalenesulfonamides **1–15**. Compounds **1–15** were screened in vitro against *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis*, and *Trypanosoma cruzi*. Sulfonamides **6e**, **10b**, and **10d** displayed remarkable activity and selectivity toward *T. cruzi* epimastigotes and amastigotes. **6e** showed significant trypanocidal activity on parasitemia in a murine model of acute Chagas disease. Moreover, **6e**, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d** displayed interesting IC₅₀ values against *Leishmania* spp promastigotes as well as *L. amazonensis* and *L. infantum* amastigotes. **9c** showed excellent in vivo activity (up to 97% inhibition of the parasite growth) in a short-term treatment murine model for acute infection by *L. infantum*. In addition, the effect of compounds **9c** and **14d** on tubulin as potential target was assessed by confocal microscopy analysis applied to *L. infantum* promastigotes.



INTRODUCTION

Protozoa of the order Kinetoplastida are the causative agents of a number of human and animal diseases including Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) and leishmaniasis (*Leishmania* spp.).¹ According to the World Health Organization, leishmaniasis is an uncontrolled tropical disease with high morbidity and mortality rates in Africa, Asia, and the Americas.² Current chemotherapy is based on pentavalent antimonials, such as sodium stibogluconate and meglumine antimoniate. Both drugs only exist in their parenteral forms and need to be used under medical supervision. Now, second-line compounds are being used, including pentamidine and amphotericin B. A new antileishmanial, miltefosine, has been used in India and currently is undergoing clinical trials in other countries. However, current drugs for leishmaniasis are toxic, expensive, and cause several adverse effects.³ Moreover, the development of drug resistance, especially in HIV-*Leishmania* coinfecting patients, has also worsened the problem.⁴

Human American trypanosomiasis or Chagas disease, mostly found in the American continent, is also an important cause of mortality and morbidity in the region.⁵ At present, the only therapeutic agents of value against Chagas disease are benznidazole and nifurtimox. Nevertheless, both drugs suppress parasitemia and are efficacious exclusively during the early stages of infection. Moreover, limitations such as the long treatment period (30, 60, or 90 days), toxicity, extreme side

effects, and regional variations in efficacy due to naturally resistant *T. cruzi* strains cause a high rate of patient noncompliance.⁶

In spite of the social and economic importance of leishmaniasis and Chagas disease, efforts directed toward the discovery of new drugs against them remain undeveloped.⁷ Therefore, there is an urgent need for the discovery of new therapeutics displaying antitrypanosomal and leishmanicidal activities.

Sulfonamide pharmacophore is an important structural core in medicinal chemistry. In the literature, sulfonamides with different pharmacological profiles, such as antimicrobial,⁸ diuretic,⁹ hypoglycaemic,¹⁰ antithyroid,¹¹ antitumoral,¹² and antiviral¹³ activities, are described. In addition, the antiparasitic efficacy of several benzenesulfonamides has also been reported.¹⁴ Thus, in vitro antileishmanial and trypanocidal effects of compounds containing the sulfonamide moiety have been shown.¹⁵ However, a limited number have been tested in murine animal models, and neither of them displayed significant in vivo activity. In this context, we have previously shown the in vivo activity of *p*-nitrobenzenesulfonamides against *Leishmania infantum*.¹⁶ This result prompted us to synthesize and in vitro evaluate novel sulfonamides for

Received: April 24, 2013

Published: October 23, 2013

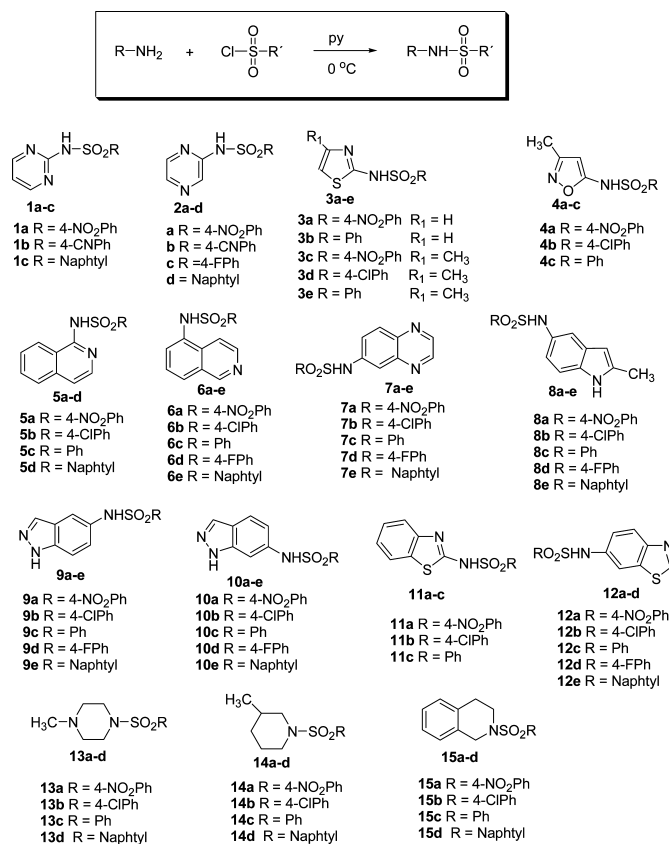


Figure 1. Synthetic reaction and structures of sulfonamide derivatives 1–15.

antiprotozoal activity against *Leishmania guayanensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, the etiological agents of most cases of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, and against *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Encouraged by our recent results,¹⁷ we report here in vivo and in vitro trypanocidal and leishmanicidal studies on more than 60 aromatic sulfonamide derivatives (three of them previously described). In order to investigate a potential mechanism of action, the antitubulin effect of the most promising sulfonamides was assessed by using immunofluorescence confocal microscopy. In addition, a structure–activity relationship (SAR) analysis will be discussed.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. Previous research from our group showed that *N*-*p*-nitrobenzenesulfonamides of 2-amine-substituted pyrimidine and pyrazine rings, sulfonamides **1a** and **2a**, displayed an interesting in vivo activity against *L. infantum*, as their administration (5 mg/kg/day for 10 days, injected ip route) led to a clear-cut parasite burden reduction (nearly 99%).¹⁶ To develop alternative structures to parent compounds **1a** and **2a**, our design approach was based on the combination of diverse monocyclic and bicyclic amines with different naphthalene and

benzenesulfonyl chlorides, to afford sulfonamides **1–15** (Figure 1). Compounds **1–15** were prepared in moderate to high yields (40–99%) by the reaction of the appropriate amines with the corresponding arylsulfonyl chlorides in anhydrous pyridine at 0 °C. The synthesis of the target compounds followed the procedure described by us for this type of derivative.¹⁶ NMR and HRMS spectral data were used to provide complete structural characterization of sulfonamides **1–15**.

BIOLOGICAL ACTIVITY

In Vitro Activity against *Leishmania* spp. and *T. cruzi*.

Sulfonamides **1–15** were tested for antiprotozoal activity against four different *Leishmania* species (*L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. amazonensis*) and *T. cruzi*, as well as for cytotoxicity against J774 macrophages and NCTC929 fibroblasts, following established procedures (see Experimental Section). Table 1 presents sulfonamide derivatives shown to be active in vitro against *Leishmania* spp. and *T. cruzi* extracellular forms (promastigotes and epimastigotes, respectively). As can be seen in Table 1, compounds **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** displayed promising IC₅₀ values against *T. cruzi* epimastigotes with a moderate–good selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀) on fibroblasts of >4.7, >1.9, >9.9, and >196.9,

Table 1. Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Sulfonamides 1–15 on Extracellular Forms (*Leishmania* promastigotes and *T. cruzi* epimastigotes) and Cytotoxicity on J774 Macrophages and NCTC929 Fibroblasts

	parasites IC ₅₀ ^b (μM)					cell lines CC ₅₀ ^b (μM)	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>	macrophages J774	fibroblasts NCTC929
1a ^f	76.4	48.8	46.4	68.6	156.1	NC ^c	ND ^d
2a ^f	66.2	61.5	84.2	NA ^a	76.1	NC	317
5a	39.5	42.5	24.6	27	136.3	41.3	ND
5b	51.4	37	4.3	82.8	NA	NC	ND
5c	NA	162.1	93.5	93.5	ND	NC	ND
6b	21	29.8	22.6	8.4	ND	60.8	ND
6e	20.3	23	15.8	24.5	97.6	NC	187
7a	81.7	60.8	101.4	197.7	NA	NC	ND
7b	51.5	80.9	25.9	46.2	ND	23.8	ND
7d	33.4	13.4	29.8	14.2	ND	43.9	ND
8a	35.2	16.8	19.6	15.8	ND	132	ND
8b	12.4	23	10.4	18.2	ND	194.8	ND
8c	23.4	29	20.9	15.4	NA	NC	ND
8d	34.5	42.7	116.6	12.5	ND	40.4	ND
8e	11.9	11.6	13.6	7.4	ND	24.6	ND
9a ^f	61.3	80.8	139.6	66.7	ND	132.9	ND
9c	37.3	40.3	47.9	38.7	NA	NC	ND
9d	65.4	86.6	101.9	115.7	NA	NC	ND
9e	37.3	39.7	52.8	37.7	ND	30	ND
10a	43.3	21.7	48.1	60.3	NA	NC	ND
10b	43.5	35.6	46.1	59.1	25.9	NC	211
10d	94.8	88.8	96.3	107.9	1.3	NC	223
12a	85.5	31	53.7	89.6	NA	NC	ND
12c	18.4	30.6	23.7	82.6	NA	NC	ND
14c	112.4	115.3	54.3	40.9	NA	NC	ND
14d	6.7	9.9	7.2	24.6	NA	NC	ND
15d	NA	NA	NA	NA	113.7	NC	>310
M ^c	17.6	7.6	44.6	34.1		135.9	ND
B ^c					54.7	NC	>194

^aNA, nonactive at tested concentrations. ^bIC₅₀, concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites; CC₅₀, concentration of the compound that produced a 50% reduction of cell viability in treated culture cells with respect to untreated ones. ^cM, miltefosine; B, benznidazole.

^dND, not determined. ^eNC (noncytotoxic), CC ≥ 300 μM. ^fData published in ref 17.

respectively. Moreover, compounds **10b** and **10d** exhibited higher activity than the reference drug benznidazole: **10b** (IC₅₀ = 25.9 μM), **10d** (IC₅₀ = 1.3 μM), and benznidazole (IC₅₀ = 54.7 μM) ($p < 0.05$ and 0.01 , respectively).

As outlined in Table 1, from the antiparasitic screening against cultured promastigotes of *Leishmania* spp., 12 compounds (**1a**, **2a**, **5b**, **6e**, **8c**, **9c**, **9d**, **10a**, **10b**, **12a**, **12c**, and **14d**) displayed activity at the micromolar level, without cytotoxicity on J774 macrophage cells (CC₅₀ ≥ 300 μM). Whereas sulfonamides **1a**, **2a**, **5b**, **9d**, and **12a** showed lower activity compared to the standard drug miltefosine, used as reference ($p < 0.05$), compounds **6e**, **8c**, **9c**, **10a**, **10b**, **12c**, and **14d** showed IC₅₀ values close to that of miltefosine ($p = 1.00$), the sulfonamides **6e**, **8c**, **9c**, **12c** and **14d** being the most active compounds. Although their potency against some *Leishmania* species was lower when compared to that of miltefosine, overall our compounds showed better selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀), resulting in promising therapeutic utility.

It is interesting to note that sulfonamide **2a** was active against all *Leishmania* species except for *L. amazonensis*, whereas compound **5b** exhibited a higher activity against *L. guyanensis* promastigotes (IC₅₀ = 4.3 μM) in comparison to those of *L. infantum* (IC₅₀ = 51.4 μM), *L. braziliensis* (IC₅₀ = 37 μM), and *L. amazonensis* (IC₅₀ = 82.8 μM). These results pointed toward

different susceptibility among *Leishmania* species to these compounds.

Sulfonamides **6e**, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d**, the most potent compounds in the antipromastigote assay (selectivity index ranging from >10.4 to >16.2 for **6a**, from >8.8 to >16.6 for **8c**, from >5.3 to >6.9 for **9c**, from >3.1 to >13.9 for **12c**, and from >10.4 to >38.2 for **14d**, among the species), could be good candidates for subsequent investigations against the clinically relevant *Leishmania* amastigote forms. Consequently, these sulfonamides were tested against *L. amazonensis* and *L. infantum* amastigotes. The antileishmanial activity of these derivatives decreased against the intracellular forms, in comparison to extracellular forms, except for **9c**, **12c**, and **14d** on *L. amazonensis*, where a higher profile against amastigotes than promastigotes was shown. Likewise, compounds **2a**, **6e**, **10b**, and **10d**, with activity against *T. cruzi* epimastigotes, were assayed in an in vitro model of intracellular *T. cruzi* amastigotes. Of the five compounds tested, sulfonamides **6e**, **10b**, and **10d** showed higher activity than the reference compound benznidazole (Table 2).

In Vivo Activity against *L. infantum*. Supported by the in vitro leishmanicidal efficacy, sulfonamides **6e**, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d** were also evaluated in vivo in a murine model of acute infection by *L. infantum*. The compounds were assayed at concentrations of 5 mg/kg, administered daily by the

Table 2. In Vitro Activity of Sulfonamides on *L. amazonensis*, *L. infantum*, and *T. cruzi* Intracellular Forms (amastigotes)

compd	intracellular amastigotes IC ₅₀ ^a (μM)		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>
2a	NA ^c	NA	223.7
6e	23.0	42.9	141.15
8c	47.3	64.1	NA
9c	83.2	30.8	NA
10b	NA	NA	12.35
10d	NA	NA	28.5
12c	39.2	77.5	NA
14d	7.1	18.0	NA
M ^b	23.7	20.9	
B ^b			192.1

^aIC₅₀: concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites. ^bM: miltefosine, B: benznidazole. ^cNA, nonactive at tested concentrations

intraperitoneal route up to a total of five doses, using a method previously described.¹⁶ In a subsequent study, an additional dose of 10 mg/kg/day of compound **9c** was also tested. The results are summarized in Table 3.

Table 3. In Vivo Antileishmanial Effect of Sulfonamides **6e, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d** against *L. infantum***

compd	percentage reduction (mean ± SD) ^a	
	spleen	liver
6e	NS ^b	NS
8c	NS	NS
9c (5 mg/kg dose)	55.50 ± 18.53*	78.90 ± 37.10*
9c (10 mg/kg dose)	96.34 ± 3.83**	97.57 ± 2.55**
12c	53.51 ± 67.09	NS
14d	80.17 ± 18.53**	NS

^aReduction of parasite burden in spleens and livers of treated mice in relation to those in the control (untreated) groups expressed as percentage. The standard deviation (SD) was calculated by comparing individual data for each treated animal with the mean value for the control group. ^bNS: No suppression of parasite burden. **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

Two out of the five compounds tested (**6e**, **8c**) did not show any *L. infantum* growth inhibition, suggesting a poor bioavailability. Compound **12c** was moderately active against spleen parasites but not against those in the liver, probably due to a rapid biotransformation of the compound in the latter organ. Compound **14d** was totally inactive against liver parasites as well; however, it exhibited high leishmanicidal activity against spleen forms (80.17 ± 18.53% reduction regarding controls). Unfortunately, the administration of **14d** was followed by the appearance of clear signs of hyperactivity together with local skin irritation. The sulfonamide **9c** was the only compound that displayed good activity against both spleen and liver parasite forms with marked increase at 10 mg/kg dose (96.34 ± 3.83% and 97.57 ± 2.55% reduction, respectively, regarding untreated controls). No evident signs of toxicity, such as gross weight loss or hair loss, were observed in any of the animals at the end of the assay, strongly suggesting that **9c** is well-tolerated by the infected mice. Therefore, sulfonamide **9c** can be seen as a promising prototype compound for treating leishmaniasis.

In Vivo Anti-*T. cruzi* Activity. Taking into consideration the in vitro anti-*T. cruzi* activity of compounds **2a**, **6e**, **10b**, and **10d**, in vivo assays in a murine model of acute infection by *T. cruzi* were performed, as previously described.^{18–20} Sulfonamides **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** were administered intraperitoneally (10 mg/kg/day) for 5 days. A group of untreated mice was also included as control.

The in vivo results are shown in Table 4. Overall, the isoquinolyl derivative **6e** exhibited the highest antiparasitic

Table 4. Percentage Reduction of *T. cruzi* Parasitemia in BALB/c Mice Treated after Three and Five Doses of Compounds **2a, **6e**, **10b**, and **10d****

compd	percentage reduction (mean ± SD)	
	8 dpi ^a (three doses ^b)	10 dpi ^a (five doses ^b)
2a	14 ± 7	57 ± 24
6e	72 ± 20	60 ± 9
10b	−10 ± 25	14 ± 15
10d	−50 ± 20	44 ± 19

^adpi: days postinfection. ^b10 mg/kg/day ip.

activity with 72% and 60% reduction of parasitemia, after the administration of three and five doses, respectively. The *p*-nitrobenzene pyrazin-2-yl derivative **2a** was less active than **6e**, with 14% and 57% reduction in parasitemia. The remaining compounds (sulfonamides **10b** and **10d**) were not active, and even an increase in parasitemia was observed after three doses. Nevertheless, when five doses of both compounds were given a reduction of 14% and 44% was recorded.

As outlined in Figure 2, the sulfonamide **6e** showed the lowest parasitemia levels after three and five doses (Figure 2A). Moreover, the percentage of survival in treated mice with this compound was higher than for untreated controls (Figure 2B). In the case of sulfonamide **2a**, the survival rate in treated mice remained always lower than that recorded for the controls. Unfortunately, compounds **10b** and **10d**, which had displayed the best in vitro IC₅₀ values (Tables 1 and 2), showed a poor in vivo activity as assessed in reduction of parasitemia (Figure 2A) as well as survival rates (Figure 2B).

These findings encourage supplementary investigations on sulfonamide **6e** as a potential new trypanocidal drug. Assays with higher dosing in frequency and/or drug quantity should be advisable.

■ CONFOCAL MICROSCOPY

In the literature, it has been reported that sulfonamides possess selective antimicrotubule activity against kinetoplastids.^{21,22} Consequently, immunofluorescence studies with confocal microscopy, using specific antibodies against β -tubulin, were carried out to evaluate the effect of sulfonamides **9c** and **14d** on the tubulin distribution profile in *L. infantum* promastigotes.

Confocal microscopic analysis clearly showed the effects of sulfonamide derivatives **9c** and **14d** on *L. infantum* promastigotes after in vitro incubation for 24 and 48 h, in comparison to untreated controls. As shown in untreated promastigotes (Figure 3, A1–A6), antitubulin antibody is homogeneously bound alongside cell cytoskeleton. This pattern is visibly altered after 24 h incubation with compound **14d**, where an irregular binding pattern of the antibody onto parasite cytoskeleton was observed (Figure 3, B1–B3). This disorganizing effect was even more dramatic after 48 h, involving also the

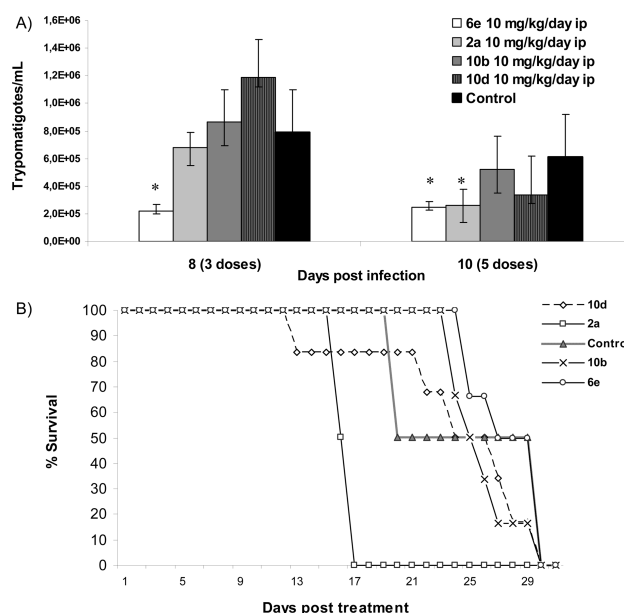


Figure 2. Survival of *T. cruzi* infected mice. (A) Parasitemia levels during the acute infection period in BALB/c mice infected with 10^4 bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi*. Mice were treated with **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** for 5 days consecutively (5–10 postinfection). Parasitemia was determined by counting the number of trypomastigotes in 5 μ L of fresh blood collected from the tail (means \pm SEMs). * $p < 0.05$. Bar (left to right): **6e**, **2a**, **10b**, **10d**, and control. (B) Percentage of mouse survival in the control and sulfonamides **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** treatment.

DNA (Figure 3, B4–B6). As shown with propidium iodide staining, the kinetoplast DNA (kDNA) is missing and the nuclei appear to be undergoing apoptosis (Figure 3, B5). Immunofluorescence images of *Leishmania* promastigotes treated with sulfonamide **9c** show a marked disorganizing effect on microtubules after 48 h of contact (Figure 3, section C1 and C4 as compared to A1 and A4). However, in contrast to compound **14d**, no evident changes on nuclear and kinetoplastid DNA were evidenced (Figure 3, C5–C6). Therefore, cytoskeleton β -tubulin appears to be exclusively targeted by compound **9c**, whereas neither nuclear nor kinetoplastid DNA seem to be altered for this compound.

Microtubules are vital for cell shape, form, motility, growth differentiation, and survival/infectivity of Kinetoplastid parasites.^{23,24} In this context, recent research has shown the antitubulin activity of sulfonamide-containing compounds,^{25,26} analogously to our results.

Structure–Activity Relationship Studies and in Silico Pharmacokinetic Evaluation. A structure–activity relationship (SAR) analysis was carried out to establish structural features for the antiprotozoal efficacy. Regarding to the relationships between the structure of the *N*-substituent on the sulfonamide moiety and the detected antiparasitic properties, it seems that the nature of the heterocyclic scaffold is important for the activity. None of the amino monocyclic aromatic derivatives (compounds **1b**, **1c**, **2b–d**, **3a–e**, and **4a–c**) showed an improvement in potency over the hit compounds **1a** and **2a** (data not shown). However, analogues where the monocyclic rings of compounds **1–4** were replaced by bicyclic heteroaromatic rings (compounds **5–12**) showed overall an increase in potency, suggesting the requirement of a benzo-

fused aromatic substructure for optimal effect. Thus, among the benzo-fused heteroaromatic series, the best in vitro activities against *Leishmania* spp. and *T. cruzi*, without toxicity on mammalian cells, were achieved by an isoquinoline (**6e**), an indole (**8c**), indazoles (**9c**, **10b**, **10d**), and a benzothiazole (**12c**). On the other hand, when ring systems containing saturated heterocycles, such as compounds **13–15**, were considered, only the naphthyl-substituted derivative 3-methylpiperidine **14d** exhibited excellent in vitro leishmanicidal efficacy. Therefore, the presence of the naphthyl substituent on the sulfonamide group seems useful for enhancing the antiprotozoal activity.

In addition, we also aim to test the influence of the substituents in the *para*-position of the benzenesulfonyl moiety. In relation to the leishmanicidal efficacy, the most active compounds against *Leishmania* amastigotes without cytotoxicity were the nonsubstituted sulfonamides **6e**, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d**, whereas the addition of an electron-withdrawing substituent did not increase the antileishmanial properties. On the other hand, the in vitro trypanocidal screening revealed the halogenated *p*-chloro- and *p*-fluorobenzenesulfonamides **10b** and **10d** as potent anti-*T. cruzi* compounds, with IC_{50} values lower than for the reference drug benznidazol.

Surprisingly, the presence of the nitro group on the benzenesulfonamide moiety did not confer good antiprotozoal activities, as might be expected taking into account our previous results.¹⁶ This fact indicates different mechanisms of action for the studied compounds, suggesting a different target. Probably, a combination of the electronic distribution, the size, and the lipophilicity of the compounds could explain the differences in the antiparasitic activity.

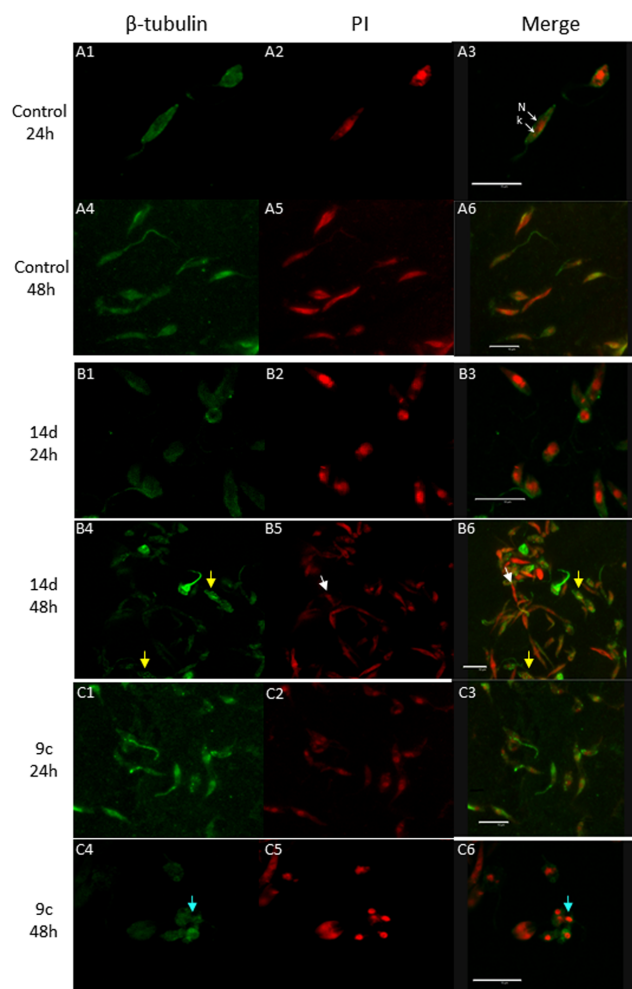


Figure 3. The effect of compounds **9c** and **14d** on tubulin in log-phase promastigotes: Section A shows untreated promastigotes after 24 h (A1–A3) and 48 h (A4–A6) incubation, section B are promastigotes after treatment with **14d** for 24 h (B1–B3) and 48 h (B4–B6), and section C shows promastigotes treated with **9c** for 24 h (C1–C3) and 48 h (C4–C6). Panels A1, A4, B1, B4, C1, and C4 show anti- β -tubulin green fluorescence; panels A2, A5, B2, B5, C2, and C5 show propidium iodide staining; and panels A3, A6, B3, B6, C3, and C6 are the merged images. Scale bar represents 10 μ m. In Figure A3, K indicates kinetoplast and N, the nucleus. Yellow arrows indicate irregular tubulin accumulation in parasite cytoskeleton, white arrows mark nuclear and kinetoplast DNA alterations, and blue arrows show a marked disorganizing effect on microtubules.

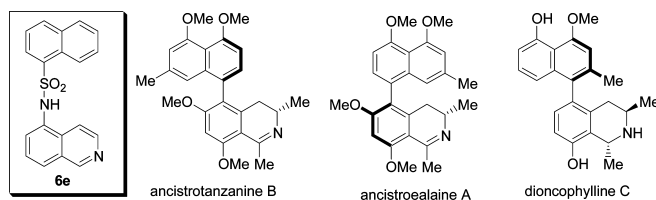


Figure 4. Naphthylisoquinoline alkaloids ancistrotanizanine B, ancistroealaine A, and dioncophylline C and the structurally related analog sulfonamide **6e**.

Remarkably, when sulfonamides were screened for in vivo activity against *T. cruzi*, quite good activity was found for compound **6e**, a simplified analog of dioncophyline C, ancistrotanzanine B, and its atropisomer ancistroealaine A, natural naphthylisoquinoline alkaloids with known activities against various tropical diseases, such as malaria, leishmaniasis, and Chagas disease.²⁷ In compound **6e**, instead of the naphthyl group at the 5-position bearing three substituents, as found in the natural naphthylisoquinoline alkaloids dioncophyline C, ancistrotanzanine B, and ancistroealaine A, a naphthyl moiety without substituents is coupled with the isoquinoline ring, through an additional sulfonamide bridge between the naphthalene and the isoquinoline portions. Moreover, the isoquinoline portion is significantly simplified by the fact that it is now devoid of the two methyl groups at C-1 and C-3, thus avoiding the existence of any of the stereogenic centers present in the natural alkaloids (Figure 4).

Finally, compounds **6e** and **9c**, the most in vivo antiprotozoal active sulfonamides, were also submitted to an in silico pharmacokinetic properties evaluation.²⁸

Since good absorption is necessary for oral administration, we analyzed the number of free rotatable bonds (n-ROTB) and Lipinski's "rule of five" for both derivatives. Lipinski descriptors describe the molecular properties for drug pharmacokinetics in the human body, especially for oral absorption. The rule states that the most "druglike" molecules present $\text{clogP} \leq 5$, molecular weight ≤ 500 , number of hydrogen bond acceptors ≤ 10 , and hydrogen bond donors ≤ 5 . Compounds **6e** and **9c**, analogously to other antileishmanial and antimalarial sulfonamides,^{15c} showed excellent n-ROTB values (≤ 10) and fulfilled the Lipinski rule of five, an important characteristic for future drug development. In addition, ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) properties were calculated using admetSAR (<http://www.admetexp.org/>), a freely accessible Web-based application.^{28b} The predicted data for BBB (blood–brain barrier) penetration, HIA (human intestinal absorption), and Caco-2 cell permeability are positive for **6e**. In the case of compound **9c**, although permeability is negative, it has a moderate probability value. In the case of metabolism, various cytochrome P450 (CYP) were evaluated. In terms of toxicity, it was found that both compounds may not show mutagenic toxicity with respect to the AMES test and carcinogen effect. Lipinski data and the predicted data of some ADMET properties of compounds **6e** and **9c** are summarized in Table 5.

CONCLUSION

In summary, we have reported the design, synthesis, and antiparasitic activity of a small library of readily available new *N*-substituted benzene and naphthalenesulfonamide derivatives **1–15**.

Compounds **6e**, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d** demonstrated potent inhibition on the promastigote form of four *Leishmania* species (*L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. amazonensis*). They were also active on the amastigote form of *L. amazonensis* and *L. infantum*. Finally, in vivo antileishmanial screening and computational studies revealed the indazolyl derivative **9c** as a good candidate for preformulation studies and clinical development.

Compounds **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** displayed remarkable activity toward *T. cruzi* epimastigotes. Studies in vivo on these sulfonamides indicated that **6e** showed a substantial reduction in parasitemia levels in a murine model of acute Chagas disease.

Table 5. Oral Bioavailability, Molecular Properties, and Predicted ADMET Properties of Compounds **6e** and **9c**^a

	6e		9c	
	result	probability (%)	result	probability (%)
Absorption				
BBB	+	96.80	+	97.33
HIA	+	99.55	+	100.00
Caco-2	+	70.12	–	51.36
Metabolism				
CYP450 2C9 substrate	NS	75.39	NS	76.15
CYP450 2D6 substrate	NS	81.45	NS	80.95
CYP450 3A4 substrate	NS	66.10	NS	65.93
CYP450 1A2 inhibitor	I	90.43	I	89.57
CYP450 2C9 inhibitor	I	61.63	I	54.59
CYP450 2D6 inhibitor	I	55.60	NI	60.41
CYP450 2C19 inhibitor	I	77.96	I	78.52
CYP450 3A4 inhibitor	NI	53.44	NI	58.57
Toxicity				
AMES toxicity	–	85.79	–	73.95
carcinogens	–	88.98	–	82.38
n-ROTB (≤ 10)	2		2	
Lipinski Molecular Descriptors				
HBA (≤ 10)	4		5	
HBD (≤ 5)	1		2	
clogP (≤ 5)	3.40 \pm 0.76		1.97 \pm 0.78	
MW (≤ 500)	334.39		273.31	

^aBBB, blood–brain barrier; HIA, human intestinal absorption; I, inhibitor; NI, noninhibitor; NS, nonsubstrate; n-ROTB, number of rotatable bonds; HBA, number of hydrogen bond acceptors; HBD, number of hydrogen bond donors; clogP, logarithm of compound partition coefficient between *n*-octanol and water; MW, molecular weight.

Moreover, **6e** showed excellent in silico Lipinski and n-ROTB values. Therefore, **6e** is a promising anti-*T. cruzi* candidate, and further clinical investigation could be useful in the development of new antichagasic drugs.

In this work, we demonstrate the antinuclear and/or antitubulin effects on *L. infantum* promastigotes of compounds **9c** and **14d**, by confocal microscopy analysis. Thus, our previous findings on the mode of action of leishmanicidal sulfonamides have been extended by using alternative molecular tools and, at the same time, opening new windows toward the precise characterization of the mechanism of action of these compounds.

In conclusion, the *N*-isoquinolin-5-yl-1-naphthalenesulfonamide (**6e**) and *N*-(1*H*-indazol-5-yl)benzenesulfonamide (**9c**) represent an important class of simple and readily obtainable compounds with promising in vivo activity against *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites and interesting in silico ADME properties. Both sulfonamides might be useful lead scaffolds in the development of new antiprotozoals, and therefore, they merit further pharmacological exploration.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry. *General.* All reagents were purchased from Aldrich and used without purification. All experiments were made under nitrogen atmosphere. Melting points were determined with a Kofler hot-stage apparatus and are uncorrected. Column chromatography was performed using silica gel (Merck 60, 70–230 mesh). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AC-300 instrument. Chemical shifts (δ values) and coupling constants (J values) are given in parts per million and hertz, respectively. HRMS were obtained using a VG Autospec TRIO 1000 instrument. The ionization mode used in mass spectra was electron impact (EI), fast atom bombardment (FAB), or time-of-flight mass spectrometry (TOFMS). Elemental analysis was performed by the Servicio de Espectroscopia Atómica, Molecular y Óptica, Universitat de València-SCSIE (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental), València, Spain. The purity of the compounds ($\geq 95\%$) and molecular mass were confirmed by elemental microanalysis and HRMS. The analytical results for C, H, and N were within ± 0.4 of the theoretical values. Compounds **1a**, **2a**, **3a**, **3c**, and **9a** were synthesized as previously described.¹⁶

General Procedure for the Synthesis of Sulfonamides 1–15. To an ice-cooled solution of the amine (20 mmol) in pyridine (8 mL) was slowly added the corresponding sulfonyl chloride (30 mmol) in pyridine (6 mL). The mixture was stirred at 0 °C for 2 h and allowed to reach room temperature. Water was added (100 mL) and the solid was collected and recrystallized from MeOH:CH₂Cl₂.

4-Cyano-N-pyrimidin-2-ylbenzenesulfonamide (1b). Yield 40%; mp 132–133 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.05 (t, J = 5, 1H), 8.06 (d, J = 8.7, 2H), 8.11 (d, J = 8.7, 2H), 8.50 (d, J = 5, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 115.4 (CH), 118.1 (C), 126.8 (CN), 128.5 (CH), 133.4 (CH), 145.4 (C), 156.8 (C), 158.6 (CH); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₁H₉N₄O₂S 261.0446, found 261.0450.

N-Pyrimidin-2-yl-1-naphthalenesulfonamide (1c). Yield 40%; mp 199–202 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.93 (t, J = 5, 1H), 7.67 (m, 3H), 8.05 (d, J = 7.5, 1H), 8.22 (d, J = 8, 1H), 8.40 (m, 3H), 8.77 (d, J = 8, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 115.7 (CH), 124.6 (CH), 124.7 (CH), 127.1 (CH), 127.8 (C), 128.4 (CH), 129.3 (CH), 131.4 (CH), 133.9 (C), 134.6 (CH), 135.3 (C), 157.2 (C), 158.6 (CH); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₄H₁₂N₃O₂S 286.0650, found 286.0647.

4-Cyano-N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamide (2b). Yield 20%; mp 107–110 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.08 (d, J = 8.3, 2H), 8.10 (d, J = 8.3, 2H), 8.15 (d, J = 2.7, 1H), 8.21 (d, J = 2.7, 1H), 8.35 (s, 1H); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₁H₉N₄O₂S 261.0446, found 261.0446.

4-Fluoro-N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamide (2c). Yield 52%; mp 212–215 °C (lit.²⁹ mp 180–181 °C); ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.42 (t, J = 9, 2H), 8.03 (dd, J = 5.3, J = 9, 2H), 8.22 (dd, J = 1.3, J = 2.6, 1H), 8.23 (d, J = 2.6, 1H), 8.36 (d, J = 1.3, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 116.6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 18, CH), 130.7 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 6, CH), 135.3 (CH), 136.6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 18, C), 139.3 (CH), 142.4 (CH), 148.3 (C), 165.0 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 250, C).

N-Pyrazin-2-yl-1-naphthalenesulfonamide (2d). Yield 99%; mp 207–210 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.70 (m, 3H), 8.09 (m, 3H), 8.25 (d, J = 8.2, 1H), 8.33 (d, J = 1.3, 1H), 8.4 (dd, J = 1.1, J = 7.4, 1H), 8.7 (d, J = 8.2, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 124.3 (CH), 124.9 (CH), 127.3 (CH), 127.6 (C), 128.7 (CH), 129.5 (CH), 131.0 (CH), 134.0 (C), 134.7 (CH), 134.8 (C), 135.1 (CH), 138.8 (CH), 142.2 (CH), 148.4 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₄H₁₂N₃O₂S 286.0650, found 286.0648.

N-Thiazol-2-ylbenzenesulfonamide (3b). Yield 57%; mp 167–170 °C (lit.³⁰ mp 171.5–172.5 °C); ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.83 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.52 (m, 3H), 7.80 (m, 2H), 12.76 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 108.6 (CH), 124.8 (CH), 126.1 (CH), 129.3 (CH), 132.4 (CH), 142.7 (C), 169.3 (C).

4-Chloro-N-(4-methylthiazol-2-yl)benzenesulfonamide (3d). Yield 50%; mp 106–108 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.06 (s, 3H), 6.33 (s, 1H), 7.58 (d, J = 8.7, 2H), 7.76 (d, J = 8.7, 2H);

HRMS (EI⁺) m/z calcd for C₁₀H₉ClN₂O₂S₂ 287.9793, found 287.9794.

N-(4-Methylthiazol-2-yl)-benzenesulfonamide (3e). Yield 30%; mp 152–153 °C (lit.³¹ mp 161–162 °C); ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.15 (s, 3H), 6.46 (s, 1H), 7.61 (m, 3H), 7.86 (dd, J = 1.7, J = 8.3, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.7 (CH₃), 102.6 (CH), 116.4 (C), 126.1 (CH), 129.2 (CH), 132.2 (CH), 135.0 (C), 168.0 (C).

N-(3-Methylisoxazol-5-yl)-4-nitrobenzenesulfonamide (4a). Yield 54%; mp 148–153 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.03 (s, 3H), 5.49 (s, 1H), 8.04 (d, J = 9.1, 2H), 8.35 (d, J = 9.1, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.8 (CH₃), 86.9 (CH), 124.8 (CH), 128.3 (CH), 147.5 (C), 149.7 (C), 160.8 (C), 165.2 (C); HRMS (EI⁺) m/z calcd for C₁₀H₉N₃O₅S 283.0262, found 283.0264.

4-Chloro-N-(3-methylisoxazol-5-yl)benzenesulfonamide (4b). Yield 45%; mp 158–160 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.29 (s, 3H), 6.14 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.8, 2H), 7.86 (d, J = 8.8, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.4 (CH₃), 95.8 (CH), 129.0 (CH), 129.9 (CH), 138.6 (C), 138.7 (C), 157.6 (C), 170.9 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₀H₁₀ClN₂O₅S 273.0101, found 273.0105.

N-(3-Methylisoxazol-5-yl)benzenesulfonamide (4c). Yield 80%; mp 146–152 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 1.95 (s, 3H), 5.74 (s, 1H), 7.60 (t, J = 7.6), 7.70 (d, J = 7.6, 1H), 7.86 (d, J = 7.6, 2H).

N-Isoquinolin-1-yl-4-nitrobenzenesulfonamide (5a). Yield 54%; mp 195–200 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.24 (d, J = 6.2, 1H), 7.65 (d, J = 6.8, 1H), 7.80 (m, 1H), 7.87 (d, J = 8, 2H), 7.95 (m, 2H), 8.20 (d, J = 8, 2H), 8.54 (d, J = 8.3, 1H), 8.95 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.7 (CH), 117.9 (C), 123.7 (CH), 124.8 (CH), 125.8 (CH), 127.2 (CH), 128.0 (CH), 129.0 (CH), 135.1 (CH), 137.3 (C), 147.7 (C), 154.3 (C), 154.4 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₅H₁₂N₃O₄S 330.0549, found 330.0547. Anal. Calcd for C₁₅H₁₁N₃O₄(H₂O)_{0.6}: C, 52.97; H, 3.61; N, 12.35; S, 9.43. Found: C, 52.85; H, 3.89; N, 12.37; S, 9.11.

4-Chloro-N-isoquinolin-1-ylbenzenesulfonamide (5b). Yield 60%; mp 183–188 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.1 (d, J = 7, 1H), 7.60 (m, 4H), 7.80 (m, 2H), 7.98 (d, J = 8.6, 2H), 8.26 (d, J = 8.3, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 110.9 (CH), 124.2 (C), 127.1 (CH), 127.2 (CH), 128.1 (CH), 128.5 (CH), 128.7 (CH), 129.5 (CH), 134.2 (CH), 137.2 (C), 142.4 (C), 148.0 (C), 152.8 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₅H₁₂ClN₂O₂S 319.0308, found 319.0313.

N-Isoquinolin-1-ylbenzenesulfonamide (5c). Yield 51%; mp 174–176 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.07 (d, J = 7, 1H), 7.57 (m, 5H), 7.80 (m, 2H), 7.98 (dd, J = 1.6, J = 8.1, 2H), 8.38 (d, J = 8.3, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 110.5 (CH), 124.3 (C), 126.1 (CH), 127.1 (CH), 127.2 (CH), 128.4 (CH), 129.4 (CH \times 2), 132.4 (CH), 134.1 (CH), 137.1 (C), 148.0 (C), 152.8 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₅H₁₃N₂O₂S 285.0698, found 285.0693. Anal. Calcd for C₁₅H₁₂N₂O₂S: C, 63.36; H, 4.25; N, 9.85; S, 11.28. Found: C, 63.15; H, 4.13; N, 9.72; S, 11.08.

N-Isoquinolin-1-yl-1-naphthalenesulfonamide (5d). Yield 87%; mp 255–258 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.23 (d, J = 7, 1H), 7.44–7.50 (m, 3H), 7.67 (d, J = 7, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.89 (d, J = 8.3, 2H), 7.97 (m, 3H), 8.54 (d, J = 8.3, 1H), 8.85 (d, J = 8.5, 1H), 8.99 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.7 (CH), 117.9 (C), 124.7 (CH), 124.8 (CH), 125.8 (CH), 126.0 (CH), 126.1 (CH), 127.9 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 129.0 (CH), 129.3 (C), 129.9 (CH), 133.9 (C), 135.1 (CH), 137.3 (C), 144.0 (C), 154.2 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₉H₁₅N₂O₂S 335.0854, found 335.0848.

N-Isoquinolin-5-yl-4-nitrobenzenesulfonamide (6a). Yield 36%; mp 265–268 °C (lit.³² mp 270 °C); ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.35 (dd, J = 1.2, J = 7.5, 1H), 7.78 (m, 2H), 8.26 (d, J = 8.9, 2H), 8.59 (d, J = 8.9, 2H), 8.62 (d, J = 6.7, 1H), 8.65 (d, J = 6.7, 1H), 9.76 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 116.9 (CH), 117.4 (CH), 120.7 (CH), 123.7 (CH), 126.7 (C), 127.7 (CH), 128.4 (C), 129.4 (C), 132.2 (CH), 145.1 (C), 147.4 (CH), 150.0 (C), 154.6 (CH).

4-Chloro-N-isoquinolin-5-ylbenzenesulfonamide (6b). Yield 84%; mp 205–207 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.58 (m, 3H), 7.66 (m, 3H), 7.99 (d, J = 6, 1H), 8.12 (d, J = 8.2, 1H), 8.51 (d, J = 6, 1H), 9.46 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 117.4 (CH), 127.7 (CH), 128.6 (CH), 128.9 (C), 129.0 (CH), 129.1 (CH), 129.8 (CH), 132.0 (C), 133.0 (C), 138.3 (C), 138.5 (C), 140.4 (CH), 151.6 (CH); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}(\text{H}_2\text{O})_{0.3}$: C, 55.57; H, 3.61; N, 8.64; S, 9.89. Found: C, 55.24; H, 3.48; N, 8.79; S, 10.27.

N-Isoquinolin-5-ylbenzenesulfonamide (6c). Yield 40%; mp 198–200 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.42 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.68 (m, 2H), 7.80 (dd, J = 3, J = 8.8, 2H), 7.97 (d, J = 8, 1H), 8.39 (d, J = 6, 1H), 9.26 (s, 1H), 10.44 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 116.0 (CH), 127.0 (CH), 127.6 (CH), 128.7 (CH), 129.2 (C), 129.6 (CH), 130.1 (CH), 131.9 (C), 133.3 (CH), 135.5 (C), 140.0 (C), 143.2 (CH), 152.8 (CH); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 285.0698, found 285.0697.

4-Fluoro-N-isoquinolin-5-ylbenzenesulfonamide (6d). Yield 95%; mp 233–237 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.35 (t, J = 8.7, 2H), 7.46 (d, J = 8, 1H), 7.61 (t, J = 8, 1H), 7.72 (dd, J = 5.2, J = 8.7, 2H), 7.80 (d, J = 6, 1H), 8.00 (d, J = 8, 1H), 8.43 (d, J = 6, 1H), 9.28 (s, 1H), 10.49 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 115.9 (CH), 116.8 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22.5, CH), 126.8 (CH), 127.6 (CH), 127.7 (CH), 129.2 (C), 130.1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 9.75, CH), 131.8 (C), 132.0 (C), 136.2 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 3, C), 143.3 (CH), 152.8 (CH), 164.7 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 250.5, C); HRMS (TOF $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ 303.0598, found 303.0605.

N-Isoquinolin-5-yl-1-naphthalenesulfonamide (6e). Yield 81%; mp 196–200 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.43 (dd, J = 1.1, J = 7.5, 1H), 7.52 (m, 2H), 7.62 (m, 2H), 7.72 (d, J = 6.5, 1H), 7.90 (d, J = 8, 1H), 8.02 (d, J = 6.5, 1H), 8.04 (d, J = 8, 1H), 8.20 (d, J = 8.3, 1H), 8.24 (dd, J = 1.1, J = 7.5, 1H), 8.78 (d, J = 8.3, 1H), 9.20 (s, 1H), 10.79 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 124.8 (CH), 126.3 (CH), 126.5 (CH), 127.3 (CH), 127.6 (CH), 128.0 (C), 128.4 (CH), 128.8 (CH), 129.4 (CH), 129.8 (CH), 129.9 (CH), 131.6 (C), 131.9 (C), 132.7 (C), 134.1 (C), 134.8 (CH), 134.9 (C), 143.0 (CH), 152.7 (CH); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: 335.0854, found 335.0862. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 68.24; H, 4.22; N, 8.38; S, 9.59. Found: C, 68.54; H, 4.00; N, 8.72; S, 9.34.

4-Nitro-N-quinoxalin-6-ylbenzenesulfonamide (7a). Yield 98%; mp 251–254 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.64 (dd, J = 2.4, J = 9, 1H); 7.72 (d, J = 2.4, 1H); 8.01 (d, J = 9, 1H); 8.11 (d, J = 9, 2H); 8.37 (d, J = 9, 2H); 8.58 (bs, 1H, NH); 8.81 (d, J = 1.9, 1H); 8.85 (d, J = 1.9, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 116.2 (CH), 124.0 (CH), 125.2 (CH), 128.7 (CH), 131.0 (CH), 138.9 (C), 139.8 (C), 143.0 (C), 144.8 (C), 145.1 (CH), 146.7 (CH), 150.4 (C); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ 331.0501, found 331.0506. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$: C, 50.90; H, 3.05; N, 16.96; S, 9.71. Found: C, 51.02; H, 3.31; N, 17.31; S, 9.53.

4-Chloro-N-quinoxalin-6-ylbenzenesulfonamide (7b). Yield 99%; mp 190–192 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.66 (m, 4H), 7.85 (d, J = 9, 2H), 8.01 (d, J = 9, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 11.2 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 115.7 (CH), 123.9 (CH), 129.0 (CH), 130.1 (CH), 130.9 (CH), 138.3 (C), 138.6 (C), 139.4 (C), 139.0 (C), 143.0 (C), 144.9 (CH), 146.6 (CH); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ 320.0261, found 320.0264. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 52.58; H, 3.15; N, 13.14; S, 10.03. Found: C, 52.63; H, 3.27; N, 13.10; S, 10.04.

N-Quinoxalin-6-ylbenzenesulfonamide (7c). Yield 46%; mp 195–200 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.57 (m, 3H), 7.62 (dd, J = 2.4, J = 9, 1H), 7.68 (d, J = 2.4, 1H), 7.87 (dd, J = 1.7, J = 7.5, 2H), 7.94 (d, J = 9, 1H), 8.6 (bs, 1H, NH); 8.78 (d, J = 1.8, 1H), 8.83 (d, J = 1.8, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 115.3 (CH), 123.8 (CH), 127.1 (CH), 129.9 (CH), 130.7 (CH), 133.7 (CH), 139.5 (C), 139.7 (C), 143.0 (C), 144.7 (CH), 146.6 (CH), 150.0 (C); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 286.0650, found 286.0647.

4-Fluoro-N-quinoxalin-6-ylbenzenesulfonamide (7d). Yield 78%; mp 186–190 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.41 (t, J = 8.8, 2H), 7.63 (dd, J = 2.3, J = 9, 1H), 7.70 (d, J = 2.3, 1H), 7.94 (dd, J = 5.1, J = 8.8, 2H), 8.01 (d, J = 9, 1H), 8.80 (d, J = 1.7, 1H), 8.84 (d, J = 1.7, 1H), 11.1 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 115.6 (CH), 117.1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 23.25, CH), 123.9 (CH), 130.2 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 9.75, CH), 130.8 (CH), 135.8 (C), 139.5 (C), 139.6 (C), 143.0 (C), 144.8 (CH), 146.6 (CH), 164.8 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 251.25, C); HRMS (TOF $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ 304.0551, found 304.0661. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 55.44; H, 3.32; N, 13.85; S, 10.57. Found: C, 55.58; H, 3.69; N, 13.96; S, 10.22.

N-Quinoxalin-6-yl-1-naphthalenesulfonamide (7e). Yield 99%; mp 115–119 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.38 (m, 1H), 7.65 (m, 4H), 7.78 (td, J = 1.5, J = 7, 1H), 7.92 (d, J = 9, 1H), 8.06 (d, J = 8.3, 1H), 8.21 (d, J = 8.3, 1H), 8.40 (dd, J = 1.3, J = 7.5, 1H), 8.58 (bs, 1H, NH), 8.73 (d, J = 2, 1H), 8.78 (d, J = 2, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 114.1 (CH), 123.0 (CH), 124.3 (CH), 124.9 (CH), 127.5 (CH), 127.6 (C), 128.8 (CH), 129.6 (CH), 130.7 (CH), 134.0 (C), 134.1 (C), 135.3 (CH), 139.2 (C), 139.4 (C), 143.0 (C), 144.5 (CH), 146.5 (CH), 149.9 (CH); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 336.0807, found 336.0805.

N-(2-Methyl-1H-indol-5-yl)-4-nitrobenzenesulfonamide (8a). Yield 94%; mp 184–186 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.31 (s, 3H), 6.02 (s, 1H), 6.69 (dd, J = 2, J = 8.5, 1H), 7.08 (m, 2H), 7.88 (d, J = 9, 2H), 8.32 (d, J = 9, 2H), 10.08 (bs, 1H, NH), 10.91 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.7 (CH $_3$), 99.6 (CH), 111.1 (CH), 114.0 (CH), 116.7 (CH), 124.7 (CH), 128.0 (C), 128.7 (CH), 129.0 (C), 134.4 (C), 137.3 (C), 145.5 (C), 149.9 (C); HRMS (EI $^+$) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 331.0626, found 331.0623. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: C, 54.37; H, 3.95; N, 12.68; S, 9.68. Found: C, 54.52; H, 4.21; N, 12.35; S, 9.47.

4-Chloro-N-(2-methyl-1H-indol-5-yl)benzenesulfonamide (8b). Yield 87%; mp 188–190 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.39 (s, 3H), 6.20 (s, 1H), 6.95 (dd, J = 2, J = 8.7, 1H), 7.06 (d, J = 2, 1H), 7.15 (d, J = 8.7, 1H), 7.55 (d, J = 8.8, 2H), 7.60 (d, J = 8.8, 2H), 9.8 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.7 (CH $_3$), 99.5 (CH), 111.0 (CH), 113.7 (CH), 116.5 (CH), 128.6 (C), 129.0 (CH), 129.5 (CH), 134.3 (2C), 137.1 (C), 137.7 (C), 138.9 (C). HRMS (TOF $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ 321.0459, found 321.0459. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}(\text{H}_2\text{O})_{0.4}$: C, 54.93; H, 4.24; N, 8.54; S, 9.78. Found: C, 54.70; H, 3.94; N, 8.78; S, 9.51.

N-(2-Methyl-1H-indol-5-yl)benzenesulfonamide (8c). Yield 84%; mp: 182–184 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.31 (s, 3H), 6.00 (s, 1H), 6.71 (dd, J = 2, J = 8.5, 1H), 7.06 (d, J = 8.5, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.47 (m, 3H), 7.65 (d, J = 7.2, 2H), 9.72 (s, 1H, NH), 10.85 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.7 (CH $_3$), 99.5 (CH), 110.9 (CH), 113.4 (CH), 116.4 (CH), 124.3 (C), 127.0 (CH), 128.9 (C), 129.3 (CH), 132.7 (CH), 134.2 (C), 137.0 (C), 140.1 (C); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 287.0854, found 287.0844. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 61.94; H, 5.02; N, 9.63; S, 11.02. Found: C, 62.22; H, 4.89; N, 9.23; S, 10.66.

4-Fluoro-N-(2-methyl-1H-indol-5-yl)benzenesulfonamide (8d). Yield 92%; mp 155–157 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.50 (s, 3H), 6.01 (s, 1H), 6.67 (dd, J = 2, J = 8.7, 1H), 7.06 (d, J = 2, 1H), 7.09 (d, J = 8.7, 1H), 7.33 (t, J = 8.8, 2H), 7.68 (dd, J = 5.1, J = 8.8, 2H), 9.74 (s, 1H, NH), 10.86 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.7 (CH $_3$), 99.5 (CH), 111.0 (CH), 113.7 (CH), 116.3 (CH), 116.6 (CH), 124.5 (C), 128.7 (C), 130.1 (CH), 134.3 (C), 136.3 (C), 137.1 (C), 162 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 260, C); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ 305.0760, found 305.0766. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}(\text{H}_2\text{O})_{0.3}$: C, 58.16; H, 4.42; N, 9.04; S, 10.35. Found: C, 58.10; H, 4.34; N, 9.16; S, 10.22.

2-Methyl-1H-indol-5-yl-1-naphthalenesulfonamide (8e). Yield 44%; mp 198–190 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.27 (s, 3H), 5.92 (s, 1H), 6.59 (dd, J = 2, J = 8.7, 1H), 6.99 (m, 2H), 7.50 (t, J = 8.1, 1H), 7.66 (td, J = 1.3, J = 7, 1H), 7.71 (td, J = 1.5, J = 7, 1H), 8.04 (m, 2H), 8.13 (d, J = 8.1, 1H), 8.80 (d, J = 8.7, 1H), 10.10 (s, 1H, NH), 10.78 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.7 (CH $_3$), 99.4 (CH), 110.9 (CH), 112.8 (CH), 115.9 (CH), 124.7

(CH), 125.0 (CH), 127.1 (CH), 128.0 (C), 128.2 (CH), 128.7 (C), 128.9 (C), 129.3 (CH), 130.0 (CH), 134.0 (C), 134.2 (CH), 135.2 (C), 137.0 (C), 145.7 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₉H₁₇N₂O₂S 337.1011, found 337.1013. Anal. Calcd for C₁₉H₁₆N₂O₂S: C, 67.83; H, 4.79; N, 8.33; S, 9.53. Found: C, 67.96; H, 5.12; N, 8.15; S, 9.32.

4-Chloro-N-(1H-indazol-5-yl)benzenesulfonamide (9b).³³ Yield 20%; mp 171–173 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.79 (m, 4H), 7.25 (dd, *J* = 0.9, *J* = 8.8, 2H), 7.73 (s, 2H), 12.57 (bs, 1H, NH), 13.06 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 100.9 (CH), 110.6 (CH), 118.5 (CH), 124.2 (C), 129.0 (CH), 129.6 (CH), 131.7 (CH), 135.0 (C), 137.9 (C), 138.6 (C), 142.4 (C).

N-(1H-Indazol-5-yl)benzenesulfonamide (9c). Yield 78%; mp 166–168 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.10 (dd, *J* = 2, *J* = 9, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.51 (m, 3H), 7.69 (dd, *J* = 1.7, *J* = 7, 2H), 7.99 (s, 1H), 10.07 (s, 1H, NH), 13.02 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.0 (CH), 113.2 (CH), 122.6 (CH), 123.1 (C), 127.0 (CH), 129.4 (CH), 130.5 (C), 133.0 (CH), 133.8 (CH), 138.0 (C), 139.7 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₂N₂O₂S 274.0650, found 274.0645. Anal. Calcd for C₁₃H₁₁N₂O₂S: C, 57.13; H, 4.06; N, 15.37; S, 11.73. Found: C, 57.28; H, 4.33; N, 15.09; S, 11.65.

4-Fluoro-N-(1H-indazol-5-yl)benzenesulfonamide (9d). Yield 89%; mp 214–218 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.06 (dd, *J* = 2, *J* = 9, 1H), 7.32 (td, *J* = 2, *J* = 8.8, 2H), 7.41 (d, *J* = 2, 1H), 7.42 (d, *J* = 9, 1H), 7.73 (dd, *J* = 5.3, *J* = 8.8, 2H), 7.99 (s, 1H), 10.0 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.1 (CH), 113.6 (CH), 116.5 (d, *J*_{C-F} = 18, CH), 122.8 (CH), 123.2 (C), 130.0 (d, *J*_{C-F} = 6, CH), 130.3 (C), 133.8 (CH), 136.0 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 138.1 (C), 164.5 (d, *J*_{C-F} = 250, C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₀FN₂O₂S 292.0556, found 292.0559. Anal. Calcd for C₁₃H₁₀FN₂O₂S: C, 53.60; H, 3.46; N, 14.42; S, 11.01. Found: C, 53.61; H, 3.30; N, 14.49; S, 10.63.

N-(1H-Indazol-5-yl)naphthalene-1-sulfonamide (9e). Yield 91%; mp 196–199 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.98 (dd, *J* = 2, *J* = 9, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.53 (t, *J* = 7.8, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.91 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.8, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.3, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.4, 1H), 8.77 (d, *J* = 8.4, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.1 (CH), 112.3 (CH), 121.9 (CH), 123.1 (C), 124.7 (CH), 124.8 (CH), 127.3 (CH), 127.9 (C), 128.4 (CH), 129.4 (CH), 130.1 (CH), 130.3 (C), 133.7 (CH), 134.0 (C), 134.5 (CH), 134.8 (C), 137.8 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₇H₁₄N₂O₂S 324.0801, found 324.0808. Anal. Calcd for C₁₇H₁₃N₂O₂S: C, 63.14; H, 4.05; N, 12.99; S, 9.92. Found: C, 63.30; H, 4.39; N, 13.20; S, 9.53.

N-(1H-Indazol-6-yl)-4-nitrobenzenesulfonamide (10a). Yield 65%; mp 185–188 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.9 (dd, *J* = 1.7, *J* = 8.7, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.95 (s, 1H), 8.0 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.35 (d, *J* = 8.8, 2H), 10.72 (bs, 1H, NH), 12.91 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 101.3 (CH), 115.5 (CH), 120.6 (C), 121.9 (CH), 125.0 (CH), 128.6 (CH), 133.8 (CH), 135.5 (C), 140.4 (C), 145.2 (C), 150.2 (C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₁N₄O₄S 319.0496, found 319.0486.

4-Chloro-N-(1H-indazol-6-yl)benzenesulfonamide (10b). Yield 95%; mp 187–191 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.89 (dd, *J* = 1.7, *J* = 8.7, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.62 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.95 (s, 1H), 10.48 (bs, 1H, NH), 12.90 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 100.9 (CH), 115.4 (CH), 120.4 (C), 121.7 (CH), 128.9 (CH), 129.8 (CH), 133.8 (CH), 136.0 (C), 138.2 (C), 138.6 (C), 140.4 (C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₁ClN₂O₂S 308.0255, found 308.0251. Anal. Calcd for C₁₃H₁₀ClN₂O₂S: C, 50.73; H, 3.27; N, 13.65; S, 10.42. Found: C, 50.49; H, 3.01; N, 13.31; S, 10.10.

N-(1H-Indazol-6-yl)benzenesulfonamide (10c). Yield 93%; mp 180–184 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.91 (dd, *J* = 2, *J* = 8.6, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.53 (m, 3H), 7.60 (d, *J* = 8.6, 1H), 7.78 (dd, *J* = 8.1, *J* = 1.5, 2H), 7.94 (s, 1H), 10.43 (bs, 1H, NH), 12.87 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 100.4 (CH), 115.2 (CH), 120.2 (C), 121.6 (CH), 127.0 (CH), 129.6 (CH), 133.3 (CH), 133.8 (CH), 136.4 (C), 139.8 (C), 140.5 (C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₂N₂O₂S 274.0645, found 274.0645. Anal. Calcd for

C₁₃H₁₁N₂O₂S: C, 56.02; H, 4.19; N, 15.08; S, 11.50. Found: C, 56.01; H, 4.46; N, 14.80; S, 11.52.

4-Fluoro-N-1H-indazol-6-ylbenzenesulfonamide (10d). Yield 96%; mp 159–162 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.88 (dd, *J* = 1.8, *J* = 8.7, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.37 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.81 (dd, *J* = 5.2, *J* = 8.8, 2H), 7.95 (s, 1H), 10.44 (s, NH), 12.89 (s, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 100.7 (CH), 115.3 (CH), 116.8 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 120.3 (C), 121.7 (CH), 130.0 (d, *J*_{C-F} = 7.5, CH), 130.3 (C), 133.9 (CH), 136.0 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 140.4 (C), 164.5 (d, *J*_{C-F} = 247.5, C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₀FN₂O₂S 292.0551, found 292.0549. Anal. Calcd for C₁₃H₁₀FN₂O₂S(H₂O)_{0.4}: C, 52.31; H, 3.65; N, 14.08; S, 10.74. Found: C, 52.11; H, 3.24; N, 13.72; S, 11.00.

N-(1H-Indazol-6-yl)naphthalene-1-sulfonamide (10e). Yield 75%; mp 207–210 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.88 (dd, *J* = 1.7, *J* = 8.7, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.59 (t, *J* = 7.8, 1H), 7.65 (dd, *J* = 7.2, *J* = 7.7, 1H), 7.75 (ddd, *J* = 1.3, *J* = 6.8, *J* = 8.5, 1H), 7.88 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.5, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.6, 1H), 8.78 (d, *J* = 8.7, 1H), 10.80 (s, 1H, NH), 12.77 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 99.3 (CH), 114.5 (CH), 120.3 (C), 121.6 (CH), 124.6 (CH), 124.8 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (C), 128.6 (CH), 129.5 (CH), 130.2 (CH), 133.7 (CH), 134.1 (C), 134.6 (C), 134.8 (CH), 136.1 (C), 140.4 (C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₇H₁₄N₂O₂S 324.0801, found 324.0798.

N-Benzothiazol-2-yl-4-nitrobenzenesulfonamide (11a).³⁴ Yield 67%; mp 244–247 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.32 (td, *J* = 2, *J* = 8.1, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 9, 2H), 7.89 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.20 (d, *J* = 9, 2H), 9.50 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 114.8 (CH), 123.3 (CH), 123.7 (CH), 124.5 (CH), 124.7 (C), 127.3 (CH), 127.8 (CH), 140.1 (C), 147.6 (C), 154.5 (C), 169.4 (C).

N-Benzothiazol-2-yl-4-chlorobenzenesulfonamide (11b).³⁵ Yield 47%; mp 212–216 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.28 (td, *J* = 1.5, *J* = 7.9, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.88 (dd, *J* = 0.4, *J* = 7.9, 1H), 9.38 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 115.1 (CH), 123.2 (CH), 124.2 (CH), 125.2 (C), 127.6 (CH), 127.8 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (C), 133.3 (C), 140.1 (C), 147.6 (C), 169.2 (C).

N-Benzothiazol-2-ylbenzenesulfonamide (11c). Yield 87%; mp 262–267 °C (lit.³⁶ mp 288–289); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.20 (td, *J* = 1.5, *J* = 7.9, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.6 (m, 3H), 7.75 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.88 (dd, *J* = 0.4, *J* = 7.9, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 113.2 (CH), 123.1 (CH), 124.1 (CH), 125.1 (C), 126.1 (CH), 127.6 (CH), 129.5 (CH), 132.8 (CH), 136.5 (C), 142.3 (C), 167.4 (C).

N-Benzothiazol-6-yl-4-nitrobenzenesulfonamide (12a). Yield 99%; mp 242–247 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.26 (dd, *J* = 2, *J* = 8.7, 1H), 7.91 (d, *J* = 2, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.7, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.35 (d, *J* = 8.8, 2H), 9.28 (s, 1H), 10.86 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 114.5 (CH), 120.7 (CH), 124.0 (CH), 125.1 (CH), 128.7 (CH), 134.9 (C), 136.5 (C), 145.0 (C), 150.2 (C), 150.7 (C), 156.4 (CH); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₀N₃O₄S₂ 336.0113, found 336.0110. Anal. Calcd for C₁₃H₉N₃O₄S₂: C, 46.56; H, 2.70; N, 12.53; S, 19.12. Found: C, 46.81; H, 2.75; N, 12.82; S, 18.76.

N-Benzothiazol-6-yl-4-chlorobenzenesulfonamide (12b). Yield 88%; mp 221–223 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.24 (dd, *J* = 2, *J* = 8.8, 1H), 7.61 (d, *J* = 6.8, 2H), 7.77 (d, *J* = 6.8, 2H), 7.88 (d, *J* = 2, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.8, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.60 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 114.0 (CH), 120.4 (CH), 123.9 (CH), 129.0 (CH), 129.8 (CH), 134.9 (C), 135.3 (C), 138.3 (C), 138.4 (C), 150.5 (C), 156.1 (CH); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₉ClN₃O₄S₂ 324.9872, found 324.9879.

N-Benzothiazol-6-ylbenzenesulfonamide (12c). Yield 96%; mp 204–208 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.26 (dd, *J* = 2, *J* = 8.8, 1H), 7.56 (m, 3H), 7.79 (d, *J* = 7, 2H), 7.87 (d, *J* = 2, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.8, 1H), 9.25 (s, 1H), 10.55 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 113.5 (CH), 120.1 (CH), 123.8 (CH), 127.0 (CH), 129.7 (CH), 133.4 (CH), 134.9 (C), 135.7 (C), 139.6 (C), 150.3 (C), 155.9 (CH); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for

$C_{13}H_{11}N_2O_2S_2$ 291.0262, found 291.0260. Anal. Calcd for $C_{13}H_{10}N_2O_2S_2$: C, 53.77; H, 3.47; N, 9.65; S, 22.09. Found: C, 53.77; H, 2.96; N, 9.49; S, 22.45.

N-Benzothiazol-6-yl-4-fluorobenzenesulfonamide (12d). Yield 97%; mp 231–233 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.25 (dd, J = 2.1, J = 8.8, 1H), 7.37 (t, J = 8.8, 2H), 7.84 (dd, J = 5.3, J = 8.8, 2H), 7.88 (d, J = 2.1, 1H), 7.95 (d, J = 8.8, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.60 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 113.8 (CH), 116.8 (d, J_{C-F} = 22.5, CH), 120.4 (CH), 123.8 (CH), 130.1 (d, J_{C-F} = 9.75, CH), 134.9 (C), 135.6 (C), 136.0 (d, J_{C-F} = 3, C), 150.4 (C), 156.0 (CH), 164.7 (d, J_{C-F} = 255, C).

N-(Benzothiazol-6-yl)naphthalene-1-sulfonamide (12e). Yield 98.5%; mp 201–203 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.19 (dd, J = 2, J = 8, 1H), 7.73 (m, 5 H), 8.06 (d, J = 7, 1H), 8.20 (d, J = 8, 1H), 8.28 (dd, J = 1.2, J = 7, 1H), 8.78 (d, J = 8, 1H), 9.20 (s, 1H), 10.96 (bs, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 112.3 (CH), 119.2 (CH), 123.7 (CH), 124.6 (CH), 124.8 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (C), 128.6 (CH), 129.5 (CH), 130.4 (CH), 134.1 (C), 134.5 (C), 134.8 (C), 134.9 (CH), 135.6 (C), 149.9 (C), 155.6 (CH); HRMS (TOF $^+$) m/z [M + H] calcd for $C_{17}H_{13}N_2O_2S_2$ 341.0413, found 341.0422.

1-Methyl-4-(4-nitrobenzenesulfonyl)piperazine (13a). Yield 42%; mp 159–160 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.14 (s, 3H), 2.36 (t, J = 4.7, 4H), 2.97 (t, J = 4.7, 4H), 8.00 (d, J = 9, 2H), 8.45 (d, J = 9, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 45.6 (CH₃), 46.0 (CH₂), 53.8 (CH₂), 125.1 (CH), 129.4 (CH), 141.1 (C), 150.4 (C).

4-Chloro-4-methylpiperazin-1-ylbenzenesulfonamide (13b). Yield 49%; mp 109–100 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.26 (s, 3H), 2.53 (m, 4H), 2.95 (m, 4H), 7.75 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 45.0 (CH₃), 45.6 (2 \times CH₂), 53.5 (2 \times CH₂), 129.8 (CH), 130 (CH), 134.1 (C), 138.7 (C); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $C_{11}H_{16}ClN_2O_2S$ 275.0621, found 275.0621.

4-Methylpiperazin-1-ylbenzenesulfonamide (13c). Yield 60%; mp 130–134 °C (lit.³⁷ mp 129–130 °C); 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.14 (s, 3H), 2.36 (t, J = 5, 4H), 2.88 (t, J = 5, 4H), 7.70 (m, 5H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 45.5 (CH₃), 46.0 (2 \times CH₂), 53.8 (2 \times CH₂), 127.9 (CH), 129.7 (CH), 133.6 (CH), 135.1 (C).

Methyl-4-(naphthalene-1-sulfonyl)piperazine (13d). Yield 99%; mp 121–124 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.06 (s, 3H), 2.26 (m, 4H), 3.06 (m, 4H), 7.69 (m, 3H), 8.13 (dd, J = 1.5, J = 8.1, 1H), 8.15 (dd, J = 1.3, J = 7.3, 1H), 8.29 (d, J = 8.3, 1H), 8.66 (d, J = 8.5, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 45.5 (2 \times CH₂), 45.6 (CH₃), 54.1 (2 \times CH₂), 124.9 (CH), 125.0 (CH), 127.3 (CH), 128.5 (CH), 129.4 (CH), 130.6 (CH), 132.3 (C), 134.3 (C), 135.0 (CH); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $C_{15}H_{19}N_2O_2S$ 291.1167, found 291.1169.

3-Methyl-1-(4-nitrobenzenesulfonyl)piperidine (14a). Yield 81%; mp 147–150 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 0.83 (d, J = 6.4, 3H), 0.87 (m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.65 (m, 3H), 1.99 (t, J = 11, 1H), 2.30 (td, J = 2.4, J = 11.5, 1H), 3.53 (t, J = 10.5, 2H), 8.0 (d, J = 9, 2H), 8.44 (d, J = 9, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 19.0 (CH₃), 24.5 (CH₂), 30.6 (CH), 31.5 (CH₂), 46.4 (CH₂), 52.8 (CH₂), 125.0 (CH), 129.3 (CH), 141.8 (C), 150.3 (C); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $C_{12}H_{17}N_2O_4S$: 285.0909, found 285.0902.

1-(4-Chlorobenzenesulfonyl)-3-methylpiperidine (14b). Yield 43.5%; mp 111–113 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 0.83 (d, J = 6.4, 3H), 0.85 (m, 1H), 1.44 (m, 1H), 1.62 (m, 3H), 1.91 (t, J = 10.5, 1H), 2.21 (td, J = 3, J = 11.5, 1H), 3.47 (m, 2H), 7.72 (m, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 19.0 (CH₃), 24.4 (CH₂), 30.5 (CH), 31.5 (CH₂), 46.4 (CH₂), 52.9 (CH₂), 129.7 (CH), 129.9 (CH), 134.8 (C), 138.3 (C); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $C_{12}H_{17}ClNO_2S$ 274.0669, found 274.0663.

1-Benzenesulfonyl-3-methylpiperidine (14c). Yield 74%; mp 98–100 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 0.82 (d, J = 6.4, 3H + m, 1H), 1.45 (m, 1H), 1.62 (m, 3H), 1.85 (t, J = 11, 1H), 2.17 (td, J = 3, J = 11.5, 1H), 3.5 (m, 2H), 7.71 (m, 5H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 19.1 (CH₃), 24.5 (CH₂), 30.5 (CH), 31.6 (CH₂), 46.5 (CH₂), 53.0 (CH₂), 127.7 (CH), 129.7 (CH), 133.6 (CH), 135.9 (C); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $C_{12}H_{18}NO_2S$ 240.1058, found 240.1061.

Anal. Calcd for $C_{12}H_{17}NO_2S$: C, 60.22; H, 7.16; N, 5.85; S, 13.40. Found: C, 60.60; H, 7.51; N, 5.66; S, 13.45.

3-Methyl-1-(naphthalene-1-sulfonyl)piperidine (14d). Yield 84%; mp 65–69 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 0.78 (d, J = 6.4, 3H), 0.9 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.62 (m, 3H), 2.2 (t, J = 10.2, 1H), 2.56 (m, 1H), 3.59 (m, 2H), 7.71 (m, 3H), 8.10 (dd, J = 1.5, J = 8.7, 1H), 8.15 (dd, J = 1.1, J = 7.5, 1H), 8.27 (d, J = 8.1, 1H), 8.67 (d, J = 8.7, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 18.9 (CH₃), 24.7 (CH₂), 30.7 (CH), 31.7 (CH₂), 45.9 (CH₂), 52.4 (CH₂), 125.0 (CH), 125.0 (CH), 127.3 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (C), 129.4 (CH), 130.2 (CH), 133.3 (C), 134.3 (C), 134.7 (CH); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $C_{16}H_{19}NO_2S$ 290.1215, found 290.1212. Anal. Calcd for $C_{16}H_{19}NO_2S(H_2O)_{0.4}$: C, 64.79; H, 6.73; N, 4.72; S, 10.81. Found: C, 65.06; H, 7.02; N, 5.07; S, 10.65.

2-(4-Nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (15a). Yield 45%; mp 171 °C (lit.³⁸ mp 161 °C); 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.86 (t, J = 6, 2H), 3.40 (t, J = 6, 2H), 4.30 (s, 2H), 7.15 (m, 4H), 8.10 (d, J = 9, 2H), 8.41 (d, J = 9, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 28.2 (CH₂), 43.8 (CH₂), 47.4 (CH₂), 125.0 (CH), 126.5 (CH), 126.7 (CH), 127.1 (CH), 129.1 (CH), 129.3 (CH), 131.7 (C), 133.2 (C), 142.2 (C), 150.4 (C).

2-(4-Chlorobenzenesulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (15b). Yield 99%; mp 154–156 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.85 (t, J = 6, 2H), 3.35 (t, J = 6, 2H), 4.22 (s, 2H), 7.14 (m, 4H), 7.70 (d, J = 8.7, 2H), 7.84 (d, J = 8.7, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 28.3 (CH₂), 43.8 (CH₂), 47.5 (CH₂), 126.5 (CH), 126.8 (CH), 127.0 (CH), 129.0 (CH), 129.7 (CH), 129.9 (CH), 131.8 (C), 133.3 (C), 135.3 (C), 138.5 (C); HRMS (TOF $^+$) m/z [M + H] calcd for $C_{15}H_{15}ClNO_2S$ 308.0507, found 308.0504.

2-Benzenesulfonyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (15c). Yield 97%; mp 156–158 °C (lit.³⁹ mp 158–159 °C); 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.84 (t, J = 5.7, 2H), 3.22 (t, J = 5.7, 2H), 4.20 (s, 2H), 7.13 (m, 4H), 7.64 (t, J = 7, 2H), 7.69 (d, J = 7, 1H), 7.82 (d, J = 7, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 28.3 (CH₂), 43.9 (CH₂), 47.6 (CH₂), 126.5 (CH), 126.8 (CH), 127.0 (CH), 127.8 (CH), 129.0 (CH), 129.8 (CH), 131.9 (C), 133.3 (C), 133.6 (CH), 136.3 (C).

2-(Naphthalen-1-sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (15d). Yield 94%; mp 135–137 °C; 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.81 (t, J = 6, 2H), 3.52 (t, J = 6, 2H), 4.40 (s, 2H), 7.12 (m, 4H), 7.7 (m, 3H), 8.1 (dd, J = 1.3, J = 8, 1H), 8.2 (dd, J = 1.3, J = 7.3, 1H), 8.28 (d, J = 8.3, 1H), 8.65 (d, J = 8.3, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 28.5 (CH₂), 43.2 (CH₂), 46.8 (CH₂), 121 (C), 124.8 (CH), 125.0 (CH), 126.4 (CH), 126.7 (CH), 127.0 (CH), 127.3 (CH), 128.3 (C), 128.6 (CH), 129.1 (CH), 129.5 (CH), 130.2 (CH), 132.2 (C), 133.4 (C), 134.3 (C), 134.9 (CH); HRMS (ES $^+$) m/z [M + H] calcd for $C_{19}H_{18}NNaO_2S$ 346.0872, found 346.0890. Anal. Calcd for $C_{19}H_{17}NO_2S$: C, 70.56; H, 5.30; N, 4.33; S, 9.91. Found: C, 70.43; H, 5.45; N, 4.34; S, 9.90.

Biological Activity. Drugs and Reagents. Resazurin sodium salt was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and stored at 4 °C protected from light. The solution of resazurin was prepared at 2.5 mM in phosphate-buffered saline solution (PBS), pH 7.4, and filtered through 0.22 μ m prior use. Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) was dissolved in 0.9% Triton X-100 (pH 7.4). Reference drugs miltefosine and benznidazole were purchased from Sigma-Aldrich. The stock solution of benznidazole was prepared in sterile distilled water with 3% Tween 80 and before use it was diluted in sterile distilled water for oral administration.

Leishmanicidal Assays. Parasites and Culture Procedure. The following species of *Leishmania* were used: an autochthonous isolate of *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150) obtained from an asymptomatic dog from the Priorat region (Catalunya, Spain), kindly given by Prof. Montserrat Portús (Universitat de Barcelona); *L. braziliensis* 2903, *L. amazonensis* (MHOM/Br/79/Maria), and *L. guyanensis* 141/93 were kindly provided by Prof. Alfredo Toraño (Instituto de Salud Carlos III, Madrid). Promastigotes were cultured in Schneider's insect medium (Sigma) at 26 °C supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma) and 100 U/mL of penicillin plus 100 μ g/mL of streptomycin (Sigma) in 25 mL culture flasks.

In Vitro Promastigote Susceptibility Assay. The assay was performed following a method previously described.¹⁶ Briefly, log-phase promastigotes (2.5×10^5 parasites/well) were cultured in 96-well plastic plates. Compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and were added at 2-fold serial dilutions up to 200 μ L final volume. The final solvent (DMSO) concentrations never exceeded 0.2% (v/v). After 48 h at 26 °C, 20 μ L of 2.5 mM resazurin solution was added and the fluorescence intensity (535 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength) was determined with a fluorometer Infinite 200 (Tecan i-Control) to calculate growth inhibition (%). All tests were carried out in triplicate. Miltefosine was used as reference drug. The efficacy of each compound was estimated by calculating the IC₅₀ (concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites) and GI% (growth inhibitory percentage).

In Vitro Intracellular Amastigote Susceptibility Assay. The assay was carried out as described by Bilbao-Ramos et al.⁴⁰ Briefly, 5×10^4 J774 macrophages and stationary promastigotes in a 1:10 ratio were seeded in each well of a microtiter plate, suspended in 200 μ L of culture medium and incubated for 24 h at 33 °C, 5% CO₂ in a humidity chamber. After this first incubation, the temperature was increased up to 37 °C for another 24 h. Thereafter, cells were washed several times in culture medium by centrifugation at 1500g for 5 min in order to remove free noninfective promastigotes. Finally, the supernatant was replaced by 200 μ L/well of culture medium containing 2-fold serial dilutions of the test compounds in a triplicate assay. Following incubation for 48 h at 37 °C, 5% CO₂ in a humidity chamber, the culture medium was replaced by 200 μ L/well of the lysis solution (RPMI-1640 with 0.048% HEPES and 0.006% SDS) and incubated at room temperature for 20 min. Thereafter, the plates were centrifuged at 1500g for 5 min and the lysis solution was replaced by 200 μ L/well of Schneider's insect medium. The culture plates were then incubated at 26 °C for other 3 days to allow transformation of viable amastigotes into promastigotes and proliferation. Afterward, 20 μ L/well of 2.5 mM resazurin was added, and the plates were left for another 3 h incubation. Finally, fluorescence emission was measured as described above.

In Vivo Leishmanicidal Assay. The in vivo assay was performed in BALB/c mice infected with the virulent *L. infantum* strain MCAN/ES/96/BCN150. The infection was carried out under the same conditions as previously described.¹⁶ Briefly, each mouse was infected with 10^7 promastigotes at stationary phase, given by the intracardiac (ic) route following anesthesia with sodium pentobarbital. The splenic and hepatic parasite burdens were estimated by the limiting dilution assay described by Titus et al.,⁴¹ adapted to the conditions of our laboratory.

The therapeutic protocols were carried out as follows: Mice were randomly sorted into eight groups. One group was kept as untreated control. Treatment started on day 21 postinfection and lasted continuously for 5 days. Animals were dosed once daily and the compounds were administered ip at 5 mg/kg in a 0.1 mL final volume of propylene glycol solution. Seven days later, the mice were sacrificed, and the parasitic burden was evaluated. In a subsequent study, a dose of 10 mg/kg/day of compound 9c was tested according to the previous schedule.

All animal experiments and procedures were approved by the institution's committee on the ethical handling and protection of laboratory animals used for experimental and other scientific purposes.

Trypanocidal Assays. Parasites and Culture Procedure. For in vitro studies, the clone CL-B5 of *T. cruzi* was used. The parasites, stably transfected with the *Escherichia coli* β -galactosidase gene (*lacZ*), were kindly provided by Dr. F. Buckner through the Universidad Complutense de Madrid (Spain). The epimastigotes were grown at 28 °C in liver infusion tryptose broth (LIT) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin, and streptomycin and harvested during the exponential growth phase.

For in vivo assays, bloodstream trypomastigotes of the Y strain were used throughout and were harvested by heart puncture from *T. cruzi*-infected BALB/c mice on the day of peak parasitemia, as described.¹⁸

Epimastigote Susceptibility Assay. The screening assay was performed in 96-well microplates (SARSTEDT) with cultures that had not reached the stationary phase, as described.⁴² Briefly,

epimastigotes were seeded at 1×10^5 per milliliter in 200 μ L. The plates were then incubated with the drugs at 28 °C for 72 h, at which time 50 μ L of the substrate solution CPRG was added to give a final concentration of 200 μ M. The plates were incubated at 37 °C for an additional 6 h and were then read at 595 nm. Benznidazole was used as reference drug. Each concentration was tested in triplicate. Each experiment was performed twice separately. The efficacy of each compound was estimated by calculating the IC₅₀.

In Vitro Intracellular Amastigote Susceptibility Assay. The activity was evaluated by colorimetric method using CPRG.⁴³ NCTC-929 fibroblasts were established in 24-well tissue culture plates at a previously determined optimal concentration of 2.5×10^3 cells/well. NCTC-929-derived trypomastigotes were added to the monolayers at a parasite:cell ratio of 5:1 and incubated for 24 h at 33 °C with 5% CO₂. The infected cells were then washed twice with PBS to remove the extracellular trypomastigotes. The drugs were added in triplicate to give a final volume of 900 μ L/well. The plates were incubated for 7 days at 33 °C. At this time, 100 μ L of CPRG solution (final concentration 400 μ M) in 0.3% Triton X-100 was added. Following 4 h of incubation at 37 °C, the colorimetric reaction was quantified by measuring optical densities (OD) at 595 nm wavelength. The results were expressed as percentages of antiamastigote activity (%AA) relative to control wells, as follows: %AA = $100 - (\text{OD experimental wells} / \text{OD control wells}) \times 100$. Background controls (only NCTC-929 cells) were subtracted from all values.

In Vivo Trypanocidal Assay. Mice Infection. BALB/c mice (20–24 g) were obtained from the Animal Facility of the Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción (UNA, Paraguay). Mice were housed at a maximum of six per cage and kept in a specific pathogen free (SPF) room at 20–24 °C under a 12/12 h light/dark cycle and provided with sterilized water and chow ad libitum. The animals were allowed to acclimate for 7 days before starting the experiments. Infection was performed by ip injection of 10^7 trypomastigotes.

All animal experiments and procedures were approved by the institution's committee on the ethical handling and protection of laboratory animals used for experimental and other scientific purposes.

Treatment. The in vivo protocol¹⁹ allows the analyses of the effect of drugs on the parasite load using BALB/c female mice infected with 10^4 bloodstream trypomastigotes from the Y strain. Compounds 2a, 6e, 10b, and 10d were dissolved in DMSO and then freshly diluted with propylene glycol. Animals are treated intraperitoneally (ip) with the compounds at 10 mg/kg/day for 5 days consecutively, with treatment beginning 5 days postinfection (dpi). Only those animals that are positive for parasitemia were used. The following parameters are followed: (i) parasitemia is evaluated microscopically by the Pizzi–Brenner method²⁰ at 5, 8, and 10 dpi and (ii) survival is defined as an animal living 30 days after the end of the treatment. Results from each compound tested according to these parameters will be compared to the results achieved following the reference protocol dosing with 100 mg/kg/day benznidazole. The mortality rates were checked daily until 30 dpi and expressed as survival percentage (%S).

Cytotoxicity Assays. Cells. J774 murine macrophages were grown in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (30 min at 56 °C), penicillin G (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL). For the experiments, cells in the preconfluence phase were harvested with trypsin. Cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified environment with 5% CO₂.

Fibroblast NCTC929 were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (50 units/mL penicillin and 50 g/mL streptomycin).

Cytotoxicity Assays on Macrophages and Fibroblasts. The procedure for cell viability measurement was evaluated with resazurin by a colorimetric method described previously.⁴³

For macrophages, J774 cell lines were seeded (5×10^4 cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100 μ L of RPMI 1640 medium. The cells were allowed to attach for 24 h at 37 °C, 5% CO₂, and the medium was replaced by different concentrations of the drugs in 200 μ L of medium and exposed for another 24 h. Growth controls were

also included. Afterward, a volume of 20 μ L of the 2.5 mM resazurin solution was added, and plates were returned to the incubator for another 3 h to evaluate cell viability. The reduction of resazurin was determined by the fluorescence intensity (535 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength) as in the promastigotes assay. Each concentration was assayed three times. Medium and drug controls were used in each test as blanks.

For fibroblasts, NCTC clone 929 cells were plated in 96-microtiter plates at 3×10^4 cells per well in 100 μ L of growth medium. The cells were grown overnight at 37 °C, 5% CO₂. Thereafter the medium was removed, and the compounds were added in 200 μ L of medium for 24 h. After incubation, 20 μ L of 2 mM resazurin solution was added to each well. The plates were incubated for 3 h to allow optimal oxidation–reduction. The plates were read at 570 and 595 nm on a microplate reader.

Cytotoxicity effect of compounds was defined as the 50% reduction of cell viability of treated culture cells with respect to untreated culture (CC₅₀).

Confocal Microscopy. *Reagents.* Mouse polyclonal anti- β -tubulin antibody was purchased from NeoMarkers (Thermo Scientific), goat anti-rabbit IgG (H+L)–Alexa Fluor 488 dye (Life Technologies) and Fluoroshield with propidium iodide (PI) were from Sigma.

Procedure. Promastigote forms of *L. infantum* in log-phase growth were treated with compounds **9c** and **14d** at concentrations corresponding to the IC₅₀ for 24 and 48 h. After incubation, the parasites were washed with PBS containing 0.25 mM MgCl₂ and 0.35 mM CaCl₂, fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with 0.2% saponin in blocking solution for 20 min (1% bovine serum albumin in PBS containing Mg²⁺ and Ca²⁺). Thereafter, promastigotes were incubated overnight in a humid chamber with anti- β -tubulin as described by Chavan et al.²⁴ Then, the parasites were washed with PBS containing Ca²⁺ and Mg²⁺ and were stained with the secondary reagent, goat anti-rabbit IgG (H+L)–dye in blocking solution for 1 h at 37 °C. Then, promastigotes were mounted in Fluoroshield with PI. Slides were then observed under a Leica DM IRE2 confocal laser scanning microscope and visualized with a Leica SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH).

Statistics. Data are reported as means of three repeated experiments. The efficacy against parasite (IC₅₀) and the cytotoxicity effect (CC₅₀) of compounds were determined by probit multilinear analysis curves. For in vitro test all data were analyzed by Tukey's HSD-test posthoc, and in vivo assays were analyzed by Mann–Whitney *U* test. Statistical significance was considered at $p \leq 0.05$ using SPSS v20.0 and Microsoft Excel 2007 software.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34 961 369 000. Fax: +34 961 395 272. E-mail: eugenia@uchceu.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Conselleria de Sanitat-Generalitat Valenciana (Projects AP158/10 and AP173/11), the Universidad Cardenal Herrera CEU (Projects PRCEU-UCH 19/10 and PRCEU-UCH 36/11), Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación (Project MAEC-AP/038991/11), and the Ministerio de Ciencia e Innovación (CONSOLIDER CSD2010-00065) for financial support. P.B.-R. is a MAEC-AECID predoctoral fellow at the Complutense University of Madrid. C.G.-R. is indebted to the Generalitat Valenciana for a contract. C.V. and M.R. are grateful to PRONII/CONACYT (Programa Nacional de Incentivo a Investigadores/Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), Paraguay.

ABBREVIATIONS USED

AA, antiamastigote activity; B, benznidazole; CC₅₀, 50% reduction of cell viability of treated culture cells with respect to untreated culture; CPRG, chlorophenol red- β -D-galactopyranoside; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; dpi, days postinfection; FBS, fetal bovine serum; GI%, growth inhibitory percentage; HIA, human intestinal absorption; I, inhibitor; LIT, liver infusion tryptose; M, miltefosine; kDNA, kinetoplastic DNA; n-ROTB, number of rotatable bonds; NI, noninhibitor; NS, nonsubstrate; PI, propidium iodide; SI, selectivity index; SPF, specific pathogen free.

REFERENCES

- (1) (a) Nussbaum, K.; Honek, J.; Cadmus, C. M. C. v. C.; Efferth, T. Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1594–1617. (b) Graebin, C. S.; Uchoa, F. D.; Bernardes, L. S. C.; Campo, V. L.; Carvalho, I.; Eifler-Lima, V. L. Antiprotozoal Agents: An Overview. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2009**, *8*, 345–366.
- (2) <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (last accessed April 9, 2013)
- (3) (a) <http://www.dndi.org/diseases/vl/current-treatment.html> (last accessed April 9, 2013). (b) Monzote, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *Open Antimicrob. Agents J.* **2009**, *1*, 9–19. (c) Cruz, A. K.; Simões de Toledo, J.; Falade, M.; Terrão, M. C.; Kamchonwongpaisan, S.; Kyle, D. E.; Uthairipibull, C. Current Treatment and Drug Discovery Against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: A Review. *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 178–192. (d) Croft, S. L. Kinetoplastida New Therapeutic Strategies. *Parasite* **2008**, *15*, S22–S27. (e) Kedzierski, L.; Sakthianandeswaren, A.; Curtis, J. M.; Andrews, P. C.; Junk, P. C.; Kedzierska, K. Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 599–614.
- (4) Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111–126.
- (5) (a) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> (last accessed April 9, 2013). (b) Rassi, A., Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. *Lancet* **2010**, *375*, 1388–1402.
- (6) (a) Castillo, E.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F.; Rangel, M.; González-Rosende, M. E. The Kinetoplastid Chemotherapy Revisited: Current Drugs, Recent Advances and Future Perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 4027–4051. (b) Filardi, L. S.; Brener, Z. Susceptibility and Natural Resistance of *Trypanosoma cruzi* Strains to Drugs Used Clinically in Chagas Disease. *Trans. R. Soc. Trop. Hyg.* **1987**, *81*, 755–759.
- (7) (a) Richard, J. V.; Werbovetz, K. A. New Antileishmanial Candidates and Lead Compounds. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 447–455. (b) Cerecetto, H.; González, M. Synthetic Medicinal Chemistry in Chagas' Disease: Compounds at The Final Stage of "Hit-To-Lead" Phase. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 810–838.
- (8) (a) Argyropoulou, I.; Geronikaki, A.; Vicini, P.; Zani, F. Synthesis and Biological Evaluation of Sulfonamide Thiazole and Benzothiazole Derivatives As Antimicrobial Agents. *Arkivoc* **2009**, *6*, 89–102. (b) Mitscher, L. A.; Lemke, T. L.; Gentry, E. J. Antibiotics and Antimicrobial Agents. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Lemke, T. L., Williams, D. A., Eds.; Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia, 2008; pp 1028–1083.
- (9) (a) Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. Diuretics with Carbonic Anhydrase Inhibitory Activity: Toward Novel Applications for Sulfonamide Drugs. In *Drug Design of Zinc–Enzyme Inhibitors*; Supuran, C. T., Winum, J.-Y., Eds.; Wiley & Sons, Inc.: New York, 2009; pp 155–170. (b) Supuran, C. T.; Scozzafava, A. Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2000**, *10*, 575–600.
- (10) (a) Navarrete-Vazquez, G.; Paoli, P.; León-Rivera, I.; Villalobos-Molina, R.; Medina-Franco, J. L.; Ortiz-Andrade, R.; Estrada-Soto, S.; Camici, G.; Diaz-Coutiño, D.; Gallardo-Ortiz, I.; Martínez-Mayorga,

- K.; Moreno-Díaz, H. Synthesis, in Vitro and Computational Studies of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition of a Small Library of 2-Arylsulfonylaminobenzothiazoles with Antihyperglycemic Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3332–3341. (b) Selam, J. L. Pharmacokinetics of Hypoglycemic Sulfonamides: Ozidia, a New Concept. *Diabetes Metab.* **1997**, *23*, 39–43.
- (11) Thornber, C. W. Isosterism and Molecular Modification in Drug Design. *Chem. Soc. Rev.* **1979**, *8*, 563–580.
- (12) (a) Shah, S. S. A.; Rivera, G.; Ashfaq, M. Recent Advances in Medicinal Chemistry of Sulfonamides. Rational Design as Anti-Tumoral, Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 70–86. (b) Abbassi, N.; Chicha, H.; Rakib, E. M.; Hannioui, A.; Alaoui, M.; Hajjaji, A.; Geffken, D.; Aiello, C.; Gangemi, R.; Rosano, C.; Viale, M. Synthesis, Antiproliferative and Apoptotic Activities of *N*-(6(4)-Indazolyl)-benzenesulfonamide Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 240–249. (c) Ghorab, M.; Fatma, M.; Ragab, A.; Hamed, M. M. Design, Synthesis and Anticancer Evaluation of Novel Tetrahydroquinoline Derivatives Containing Sulfonamide Moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4211–4217. (d) Hu, L.; Li, Z.; Jiang, J.; Boykin, D. W. Novel Diaryl or Heterocyclic Sulfonamides As Antimitotic Agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 739–745.
- (13) (a) Wolfe, C.; Hicks, C. Profile of Darunavir in the Management of Treatment-Experienced HIV Patients. *HIV/AIDS* **2009**, *1*, 13–21. (b) Stranix, B. R.; Lavallée, J. F.; Seigny, G.; Yelle, J.; Perron, V.; LeBerre, N.; Herbart, D.; Wu, J. J. Lysine Sulfonamides as Novel HIV-Protease Inhibitors: *N*-Acyl Aromatic α -Amino Acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3459–3462. (c) Supuran, C. T.; Innocenti, A.; Mastrolorenzo, A.; Scozzafava, A. Antiviral Sulfonamide Derivatives. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 189–200.
- (14) (a) Martyn, D. C.; Cortese, J. F.; Tyndall, E.; Dick, J.; Mazitschek, R.; Munoz, B.; Clardy, J. Antiplasmodial Activity of Piperazine Sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 218–221. (b) Hernandez-Nunez, E.; Tlahuext, H.; Moo-Puc, R.; Torres-Gomez, H.; Reyes-Martinez, R.; Cedillo-Rivera, R.; Nava-Zuazo, C.; Navarrete-Vazquez, G. Synthesis and in Vitro Trichomonocidal, Giardicidal and Amebicidal Activity of *N*-Acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1*H*-imidazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2975–2984. (c) Ekoue-Kovi, K.; Yearick, K.; Iwaniuk, D. P.; Natarajan, J. K.; Alumasa, J.; de Dios, A. C.; Roepe, P. D.; Wolf, C. Synthesis and Antimalarial Activity of New 4-Amino-7-chloroquinolyl Amides, Sulfonamides, Ureas and Thioureas. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 270–283. (d) Parai, M. K.; Panda, G.; Srivastava, K.; Puri, S. K. Design, Synthesis and Antimalarial Activity of Benzene and Isoquinoline Sulfonamide Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 776–778. (e) Krungrai, J.; Krungrai, S. R.; Supuran, C. T. Malarial Parasite Carbonic Anhydrase and Its Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 909–917. (f) Norose, K.; Aosai, F.; Mun, H.-S.; Yano, A. Effects of Sulfamethoxazole on Murine Ocular Toxoplasmosis in Interferon- γ Knockout Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*, 265–271.
- (15) (a) Papadopoloulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Chatelain, E.; Kaiser, M.; Wilkinson, S. R.; McKenzie, C.; Ioset, J.-R. Novel 3-Nitro-1*H*-1,2,4-triazole-Based Amides and Sulfonamides as Potential Antitrypanosomal Agents. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5554–5565. (b) Marra, R. K. F.; Bernardino, A. M. R.; Proux, T. A.; Charret, K. S.; Lira, M.-L. F.; Castro, H. C.; Souza, A. M. T.; Oliveira, C. D.; Borges, J. C.; Rodrigues, C. R.; Canto-Cavaleiro, M. M.; Leon, L. L.; Amaral, V. F. 4-(1*H*-Pyrazol-1-yl)benzenesulfonamide Derivatives: Identifying New Active Antileishmanial Structures for Use against a Neglected Disease. *Molecules* **2012**, *17*, 12961–12973. (c) Barea, C.; Pabón, A.; Castillo, D.; Zimic, M.; Quiliano, M.; Galiano, S.; Pérez-Silanes, S.; Monge, A.; Deharo, E.; Aldana, I. New Salicylamide and Sulfonamide Derivatives of Quinoxaline 1,4-Di-*N*-oxide with Antileishmanial and Antimalarial Activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4498–502. (d) Goodarzi, M.; da Cunha, E. F. F.; Freitas, M. P.; Ramalho, T. C. QSAR and Docking Studies of Novel Antileishmanial Diaryl Sulfides and Sulfonamides. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4879–4889. (e) Paglierio, R. J.; Lusvarghi, S.; Pierini, A. B.; Brun, R.; Mazzieri, M. R. Synthesis, Stereoelectronic Characterization and Antiparasitic Activity of New 1-Benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 142–150. (f) da Silva, L. E.; de Sousa, P. T., Jr.; Maciel, E. N.; Nunes, R. K.; Eger, I.; Steindel, M.; Rebelo, R. A. In Vitro Antiprotozoal Evaluation of Zinc and Copper Complexes Based on Sulfonamides Containing 8-Aminoquinoline Ligands. *Lett. Drug Des. Discovery* **2010**, *7*, 679–685. (g) Souza, A. M. T.; Castro, H. C.; Brito, M. A.; Andrighetti-Frohner, C. R.; Magalhaes, U. O.; Oliveira, K. N.; Gaspar-Silva, D.; Pacheco, L. K.; Joussef, A. C.; Steindel, M.; Simoes, C. M. O.; Santos, D. O.; Albuquerque, M. G.; Rodrigues, C. R.; Nunes, R. J. *Leishmania amazonensis* Growth Inhibitors: Biological and Theoretical Features of Sulfonamide 4-Methoxychalcone Derivatives. *Curr. Microbiol.* **2009**, *59*, 374–379. (h) Khan, K. M.; Khan, M. Z.; Taha, M.; Maharvi, G. M.; Saify, Z. S.; Parveen, S.; Choudhary, M. I. Leishmanicidal Potential of *N*-Substituted Morpholine Derivatives: Synthesis and Structure–Activity Relationships. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23*, 479–484. (i) Altenkamper, M.; Bechem, B.; Perruchon, J.; Heinrich, S.; Madel, A.; Ortmann, R.; Dahse, H.-M.; Freunschdt, E.; Wang, Y.; Rath, J.; Stich, A.; Hitzler, M.; Chiba, P.; Lanzer, M.; Schlitzer, M. Antimalarial and Antitrypanosomal Activity of a Series of Amide and Sulfonamide Derivatives of a 2,5-Diaminobenzophenone. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7690–7697. (j) Ajibade, P. A.; Kolawole, G. A.; Brien, P. O. Metal Complexes of 4-Amino-*N*-(2-pyrimidinyl)benzene Sulfonamide: Synthesis, Characterization and Antiprotozoal Studies. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Metal Chem.* **2007**, *37*, 653–659.
- (16) Dea-Ayuela, M. A.; Castillo, E.; González-Álvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Bolas-Fernández, F.; Borras, J.; González-Rosende, M. E. In Vivo and in Vitro Anti-Leishmanial Activities of 4-Nitro-*N*-pyrimidin- and *N*-Pyrizin-2-ylbenzenesulfonamides, and *N*-(4-Nitrophenyl)-*N*¹-propylglycinamide. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7449–7456.
- (17) Bilbao-Ramos, P.; Galiana-Roselló, C.; Dea-Ayuela, M. A.; González-Álvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Pérez-Serrano, J.; Bolas-Fernández, F.; González-Rosende, M. E. Nuclease Activity and Ultrastructural Effects of New Sulfonamides with Anti-Leishmanial and Trypanocidal Activities. *Parasitol. Int.* **2012**, *61*, 604–613.
- (18) Meirelles, M. N.; de Araújo Jorge, T. C.; de Souza, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with Macrophages in Vitro: Dissociation of the Attachment and Internalization Phases by Low Temperature and Cytochalasin B. *Z. Parasitenkd.* **1982**, *68*, 7–14.
- (19) Romanha, A. J.; Castro, S. L.; Soeiro, M.; de, N.; Lannes-Vieira, J.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; Blum, B.; Olivieri, B.; Zani, C.; Spadafora, C.; Chiari, E.; Chatelain, E.; Chaves, G.; Calzada, J. E.; Bustamante, J. M.; Freitas-Junior, L. H.; Romero, L. L.; Bahia, M. T.; Lotrowska, M.; Soares, M.; Andrade, S. G.; Armstrong, T.; Degraeve, W.; Andrade, Z.; de, A. In Vitro and in Vivo Experimental Models for Drug Screening and Development for Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 233–238.
- (20) Brener, Z. Therapeutic Activity and Criterion of Cure on Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1962**, *4*, 386–396.
- (21) Lama, R.; Sandhu, R.; Zhong, B.; Li, B.; Su, B. Identification of Selective Tubulin Inhibitors as Potential Anti-Trypanosomal Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5508–5516.
- (22) George, T. G.; Endeshaw, M. M.; Morgan, R. E.; Mahasenan, K. V.; Delfin, D. A.; Mukherjee, M. S.; Yakovich, A. J.; Fotie, J.; Li, C.; Werbovetz, K. A. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of 3,5-Substituted-*N*¹-phenyl-*N*⁴,*N*⁴-di-*n*-butylsulfanilamides as Antikinetoplastid Antimicrotubule Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6071–6079.
- (23) Kohl, L.; Gull, K. Molecular Architecture of the Trypanosome Cytoskeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *93*, 1–9.
- (24) Chavan, H. D.; Singh, G.; Dey, C. S. Confocal Microscopic Investigation of Tubulin Distribution and Effect of Paclitaxel on Posttranslationally Modified Tubulins in Sodium Arsenite Resistant *Leishmania donovani*. *Exp. Parasitol.* **2007**, *116*, 320–326.
- (25) Chang, J. Y.; Hsieh, H. P.; Chang, C. Y.; Hsu, K. S.; Chiang, Y. F.; Chen, C. M.; Kuo, C. C.; Liou, J. P. 7-Aroyl-aminoindoline-1-sulfonamides as a Novel Class of Potent Antitubulin Agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6656–6659.

- (26) Yoshimatsu, K.; Yamaguchi, A.; Yoshino, H.; Koyanagi, N.; Kitoh, K. Mechanism of Action of E7010, an Orally Active Sulfonamide Antitumor Agent: Inhibition of Mitosis by Binding to the Colchicine Site of Tubulin. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3208–3213.
- (27) (a) Bringmann, G.; Zhang, G.; Ölschlager, T.; Stich, A.; Wud, J.; Chatterjee, M.; Brun, R. Highly Selective Antiplasmodial Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*. *Phytochemistry* **2013**, *91*, 220–228. (b) Bringmann, G.; Brun, R.; Kaiser, M.; Neumann, S. Synthesis and Antiprotozoal Activities of Simplified Analogs of Naphthylisoquinoline Alkaloids. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 32–42. (c) Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A. Mode of Action of Natural and Synthetic Drugs against *Trypanosoma cruzi* and Their Interaction with the Mammalian Host. *Comp. Biochem. Phys. A* **2007**, *146*, 601–620.
- (28) (a) Calculated by using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V 11.02 (copyright 1994–2012 ACD/Labs). (b) Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Lee, P. W.; Tang, Y. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Evaluating Chemical ADMET Properties. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3099–3105.
- (29) Vigorita, M. G.; Grasso, S.; Zappala, M.; Ottana, R.; Monforte, M. T.; Barbera, R.; Trovato, A. Aminopyrazinyl Derivatives: Synthesis and Evaluation of Antiinflammatory and Related Activities. *Farmaco* **1994**, *49*, 271–276.
- (30) Cejudo, R.; Alzueta, G.; González-Alvarez, M.; García-Giménez, J. L.; Borras, J.; Liu-González, M. DNA Cleavage Reaction Induced by Dimeric Copper(II) Complexes of *N*-Substituted Thiazole Sulfonamides. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 70–79.
- (31) Sprague, J. M.; Kissinger, L. W. Sulfonamido Derivatives of Thiazoles. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 578–580.
- (32) Hill, A. J.; Hall, G. E. Some Sulfanilamide Derivatives of the Isoquinoline Series. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 666–668.
- (33) Li, X.; Chu, S.; Feher, V. A.; Khalili, M.; Nie, Z.; Margosiak, S.; Nikulin, V.; Levin, J.; Sprankle, K. G.; Tedder, M. E.; Almassy, R.; Appelt, K.; Yager, K. M. Structure-Based Design, Synthesis, and Antimicrobial Activity of Indazole-Derived SAH/MTA Nucleosidase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5663–5673.
- (34) Xu, X.; Weitzberg, M.; Keyes, R. F.; Li, Q.; Wang, R.; Wang, X.; Zhang, X.; Frevert, E. U.; Camp, H. S.; Beutel, B. A.; Sham, H. L.; Gu, Y. G. The Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Selective Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors Containing 4-(Thiazol-5-yl)but-3-yn-2-amino Motif: Polar Region Modifications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1803–1807.
- (35) Verma, S. M.; Khani, L.; Gunakkunru, A.; Saha, A. Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some Heterocyclic Sulfonamides. *J. Inst. Chem. (India)* **2008**, *80*, 8–13.
- (36) Lacova, M.; Nga, N. T.; Halgas, J. Vilsmeier–Haack Reaction of 2-Amino-*X*-benzothiazoles with *N*-Phenylformamide in the Presence of Benzenesulfonyl Chloride. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1988**, *53*, 311–318.
- (37) Jacob, R. M. 1-Alkylsulfonyl-4-alkylpiperazines. US Patent 2507408, 1950.
- (38) Ito, K.; Tanaka, H. Syntheses of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines from *N*-Sulfonylphenethylamines and Aldehydes. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 1732–1739.
- (39) Lukanov, L.; Venkov, A.; Mollov, N. Application of the Intramolecular α -Amidoalkylation Reaction for the Synthesis of 2-(Arylsulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines. *Synthesis* **1987**, 204–206.
- (40) Bilbao-Ramos, P.; Sifontes-Rodríguez, S.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F. A Fluorometric Method for Evaluation of Pharmacological Activity against Intracellular *Leishmania* Amastigotes. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *89*, 8–11.
- (41) Titus, R. G.; Marchand, M.; Boon, T.; Louis, J. A. A Limiting Dilution Assay for Quantifying *Leishmania major* in Tissues of Infected Mice. *Parasite Immunol.* **1985**, *7*, 545–555.
- (42) Vega, C.; Rolón, M.; Martínez-Fernández, A. R.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A. A New Pharmacological Screening Assay with *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Expressing beta-Galactosidase. *Parasitol. Res.* **2005**, *95*, 296–298.
- (43) Rolón, M.; Seco, E. M.; Vega, C.; Nogal, J. J.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A.; Malpartida, F. Selective Activity of Polyene Macrolides Produced by Genetically Modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *28*, 104–109.

Synthetic Oxoisoaporphine Alkaloids: In Vitro, In Vivo and In Silico Assessment of Antileishmanial Activities

Eduardo Sobarzo-Sánchez^{1,2}, Pablo Bilbao-Ramos³, Maria Dea-Ayuela⁴, Humberto González-Díaz^{5a,b}, Matilde Yañez⁶, Eugenio Uriarte⁷, Lourdes Santana⁷, Victoria Martínez-Sernández⁵, Francisco Bolás-Fernández³, Florencio M. Ubeira^{5*}

1 Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, **2** Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile, **3** Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **4** Departamento de Farmacia, Universidad Cardenal Herrera, Valencia, Spain, **5** Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, **6** Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, **7** Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Abstract

Leishmaniasis is a growing health problem worldwide. As there are certain drawbacks with the drugs currently used to treat human leishmaniasis and resistance to these drugs is emerging, there is a need to develop novel antileishmanial compounds, among which isoquinoline alkaloids are promising candidates. In this study, 18 novel oxoisoaporphine derivatives were synthesized and their possible antileishmanial activity was evaluated. The in vitro activity of these derivatives against *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes was first evaluated, and the selected compounds were then tested in an inhibition assay with promastigotes of *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. guyanensis*, and with intracellular amastigotes of *L. infantum* and *L. amazonensis*. Finally, the most active compounds, OXO 1 (2,3-dihydro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-one) and OXO 13 (2,3,8,9,10,11-hexahydro-7H-dibenzo[de,h]quinolin-7-one), were tested in BALB/c mice infected with *L. infantum*. Treatment of mice at a dose of 10 mg/kg with OXO 1 yielded significant reductions ($p < 0.05$) in parasite burden in liver and spleen (99% and 78%, respectively) whereas with OXO 13 were not significant. Although previous reports suggest that this family of molecules displays inhibitory activity against monoamine oxidase A and acetylcholinesterase, these enzymes were not confirmed as targets for antileishmanial activity on the basis of the present results. However, after development of a new bioinformatics model to analyze the *Leishmania* proteome, we were able to identify other putative targets for these molecules. The most promising candidates were four proteins: two putative pteridine reductase 2 (1MXF and 1MXH), one *N*-myristoyltransferase (2WUU) and one type I topoisomerase (2B9S).

Citation: Sobarzo-Sánchez E, Bilbao-Ramos P, Dea-Ayuela M, González-Díaz H, Yañez M, et al. (2013) Synthetic Oxoisoaporphine Alkaloids: In Vitro, In Vivo and In Silico Assessment of Antileishmanial Activities. PLoS ONE 8(10): e77560. doi:10.1371/journal.pone.0077560

Editor: Abhay R. Satoskar, The Ohio State University, United States of America

Received: April 26, 2013; **Accepted:** September 3, 2013; **Published:** October 29, 2013

Copyright: © 2013 Sobarzo-Sánchez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was partially financed by grants AGL2011-30563-C03-01 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación and A-024457/09 from the Spanish Agency for International Cooperation and Development (AECID). Eduardo Sobarzo-Sánchez is grateful to the Xunta de Galicia (Spain) for the "Isidro Parga Pondal" fellowship. Pablo Bilbao-Ramos is thankful to the MAEC-AECID for a PhD fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fm.ubeira@usc.es

^a Current address: Departamento de Química Orgánica II, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Bizkaia, País Vasco, Spain

^b Current address: IKERBASQUE, Fundación Vasca para la Ciencia, Bilbao, Spain

Introduction

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by an obligate intra-macrophage protozoan parasite. The disease, which is endemic in large areas of tropical and subtropical countries, is caused by more than 20 species of *Leishmania* and transmitted to humans by more than 30 different species of phlebotomine sandflies. The clinical manifestations of leishmaniasis largely depend on complex interactions between the virulence of the infecting *Leishmania* species and the immune responses of the host. The three major clinical syndromes that are recognized in human disease are visceral, cutaneous and muco-cutaneous leishmaniasis [1].

Leishmaniasis is a major public health problem and the burden is increasing. An estimated 2 million new cases (1.5 million cases of cutaneous leishmaniasis and 500,000 of visceral leishmaniasis)

occur annually, and about 12 million people are currently infected [2]. This epidemiological scenario has worsened because dogs are the principal reservoirs as well as suffers of the disease, for which fully successful treatment is still lacking [3].

At present, the following drugs are used to treat human leishmaniasis: pentavalent antimonials, paromomycin, amphotericin, miltefosine and pentamidine. However, there is an urgent need to develop new antileishmanial drug candidates to overcome problems such as toxic side effects, route of administration, long-term treatment and the generation of resistance mechanisms to current drugs [4].

Possible new antileishmanial compounds include oxoaporphines, which are widely distributed in nature and are of pharmacological importance in the treatment of certain cancers and parasitic diseases. For example, lirioidenine is a oxoaporphine isolated from a variety of species belonging to the families

Annonaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae and Rutaceae [5], and which has been shown to be active against *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. guyanensis* and *L. major* [6,7,8,9]. Liriodenine is a potent inhibitor of topoisomerase II and also displays other types of activity, such as antibacterial, antifungal, antitumor and antiviral activity [5,10]. Other oxoaporphines reported to possess antileishmanial activity include dicentrinone, obtained from the stem bark of *Duguetia furfuracea*, and *N*-methyliriodendronine, isolated from *Stephania dinklagei*; these have been shown to be active against *L. braziliensis* [10] and *L. donovani* [7], respectively. In addition to oxoaporphines, a small group of isomers (oxoisoaporphines) that occur in some Chinese medicinal plants, such as the roots of *Menispermum dauricum*, may exert leishmanicidal activity. However, these isomers have not been well studied, mainly because of the low concentrations at which they occur in the plants. Given the potential interest in these compounds for treating leishmaniasis, the aim of the present study was to investigate, for the first time, the in vitro and in vivo leishmanicidal activity of several novel synthetic oxoisoaporphine compounds. In addition, we have also developed a new bioinformatics tool for predicting putative targets of these molecules in the parasite proteome.

Materials and Methods

Ethics Statement

All procedures for animal manipulations were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Complutense University of Madrid, following Spanish law.

Synthesis of Oxoisoaporphine Derivatives (OXO 1–18)

The compounds used in the present study were synthesized according to a previously described general procedure [11–13].

Reference Drugs

Miltefosine and rasagiline were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

In vitro Assays with *Leishmania* Axenic Amastigotes

For preliminary screening of potential active compounds, axenic amastigotes of *L. amazonensis* (strain MHOM/BR/76/LTB-012) were arbitrarily chosen and cultured according to Estevez et al. [14]. The axenic amastigotes were cultured in medium supplemented with 20% foetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich) and incubated at 32°C with 5% CO₂ in 25 cm² culture bottles. In order to determine the activity of the compounds, a colorimetric method with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) was used, as previously described [15]. The compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and added to wells of microtiter plates containing 100 µl of cultivated amastigotes (in logarithmic growth phase) to final concentrations ranging from 0.05 µg/ml to 50 µg/ml. The plates were incubated for 72 h, and 10 µl of the MTT solution (10 mg/ml in PBS) were then added to each well and incubated for a further 4 h. The reaction was stopped by addition of 100 µl of isopropanol-sodium dodecyl sulphate (SDS). Finally, the optical density (OD) was read at 570 nm. All experiments were carried out in triplicate.

In vitro Assays with *Leishmania* Promastigotes

For these assays, the following *Leishmania* species were used: an autochthonous isolate of *L. infantum* (MCAN/ES/92/BCN83) obtained from an asymptomatic dog in the Priorat region of Catalunya (Spain) and kindly donated by Prof. Montserrat Portús

(University of Barcelona); and *L. braziliensis* 2903, *L. amazonensis* (MHOM/Br/79/Maria) and *L. guyanensis* 141/93, kindly provided by Prof. Alfredo Toraño (Instituto del Salud Carlos III, Madrid). The promastigotes were cultured at 26°C in Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 100 U/ml of penicillin plus 100 µg/ml of streptomycin (Sigma-Aldrich), in 25 ml culture flasks.

To test the oxoisoaporphine compounds, promastigotes of each species (2.5×10^5 parasites/well) were cultured in 96-well microtiter plates. The compounds were dissolved in DMSO and diluted in the culture medium at concentrations ranging from 0.8 to 100 µg/ml in a final volume of 200 µl. Miltefosine was used as the reference drug. After incubation for 48 h at 26°C, 20 µl of 2.5 mM resazurin (Sigma-Aldrich) solution were added to each well, and the fluorescence intensity (535 nm -excitation wavelength- and 590 nm -emission wavelength) was measured in a fluorometer (Infinite 200, Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland). All tests were carried out in triplicate.

In vitro Assays with *Leishmania* Intracellular Amastigotes

The fluorometric assay for drug screening against intracellular amastigotes was carried out as described by Bilbao-Ramos et al. [16]. Briefly, 5×10^4 macrophages and stationary promastigotes at a 1:10 ratio in 200 µl/well of culture medium were seeded and the plates were incubated for 24 h at 33°C, 5% CO₂ in humidity chamber. The temperature was then increased to 37°C for another 24 h. The cells were then washed several times to remove free non-infective promastigotes; the final washing medium was replaced with 200 µl/well of culture medium containing 2-fold serial dilutions of the test compounds in a triplicate assay. Miltefosine was included as reference drug. After incubation of the plates for 48 h at 37°C, 5% CO₂, the culture medium was replaced with an equal volume of the lysis solution (RPMI-1640 with 0.048% HEPES and 0.006% SDS) and maintained at room temperature for 20 min. The lysis solution was then replaced with Schneider's medium followed by incubation at 26°C for another 3 days to allow transformation of viable amastigotes into promastigotes and subsequent proliferation. Aliquots of 20 µl of 2.5 mM resazurin were added to each well and the plates were incubated for 3 h. Finally, fluorescence emission was measured as described above.

Macrophage Cytotoxicity Assays

Toxicity cell assays were carried out as described elsewhere [17]. To test the oxoisoaporphine compounds, the J774.2 cells (EACC 80011428) were seeded (5×10^4 cells/well) in 96-well flat bottomed microplates and allowed to adhere for 24 h at 37°C in 5% CO₂. The medium was then replaced with different concentrations of the test compounds, followed by incubation for another 24 h. Each concentration was assayed three times and growth controls were also included. Thereafter, 20 µl of a 2.5 mM resazurin solution were added to each well and the plates were incubated for 3 h. The fluorescence emission was measured as indicated above.

In vivo Assays

Experimental infection. The experimental infections were carried out in groups of 6–8 BALB/c mice, aged 6–8 weeks. Amastigotes of *L. infantum* (MCAN/ES/92/BCN83) were harvested from spleens of infected hamsters and then cultured in NNN medium containing penicillin (200 IU) and streptomycin (2 mg/ml) for 2 days, until transformation into promastigotes. Promastigotes were grown for 7 days, as described elsewhere [18], and were then harvested, washed and resuspended for counting. The

animals were anaesthetized with sodium pentobarbital and then infected with 10^7 promastigotes per animal, administered via the intracardiac route.

Treatment. The treatments began on day 35 post-infection and were administered on 3 continuous days. The compounds were first dissolved in DMSO and diluted in physiological saline to provide doses of 2.5, 5 and 10 mg/kg, which were administered daily by the intraperitoneal route in a final volume of 0.1 ml. One group administered with the vehicle alone was used as an untreated control and another group was treated with miltefosine as reference drug. Miltefosine was administered intraperitoneally for purposes of comparison with test compounds. Five days later, the mice were killed and the parasitic burden was estimated.

Estimation of parasite burden. The liver and spleen were removed from each animal and homogenised. After eliminating cell debris, the suspension was centrifuged, the supernatants were discarded and the pellets were resuspended as previously described [18]. Aliquots (200 μ l) of the suspension were transferred to each well of 96-well microtiter plates containing NNN medium supplemented with antibiotics. The parasite burden was estimated by the limit dilution assay, according to Hill et al. [19] and Titus et al. [20].

Statistical Analysis

For in vitro assays, the antiparasitic activity and cytotoxic effect of compounds, expressed as IC_{50} (or IC_{90}) and CC_{50} , respectively, were assessed by multinomial probit analysis. For in vivo assays, the data were analyzed by Tukey's HSD post-hoc test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. SPSS v20.0 and Microsoft Excel 2007 software were used for all analyses.

Determination of the Inhibitory Activity Against the Monoamine Oxidase (MAO) A and B Enzymes

The potential effects of the tested drugs on hMAO activity were previously investigated [21] using the Amplex[®] Red MAO assay kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, USA) and microsomal MAO isoforms prepared from insect cells (BTI-TN-5B1-4) infected with recombinant baculovirus containing cDNA inserts for hMAO-A or hMAO-B [22].

Determination of Inhibition of the Cholinesterase Enzyme

The cholinesterase assay method of Ellman [23] was used to determine the in vitro cholinesterase activity. The assay medium contained 50 mM PBS, pH 8.0, 20 mM dithiobisnitrobenzoate (DTNB; Sigma-Aldrich), 0.165 U/ml of recombinant acetylcholinesterase (AChE) expressed in HEK 293 cells (Sigma-Aldrich) and 0.75 μ M substrate (acetylthiocholine iodide; Sigma-Aldrich). The activity was determined by measuring the increase in absorbance at 412 nm in a FLUOstar Optima microplate reader (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Germany), at 1 min intervals, for 10 min at 37°C. In dose-dependent inhibition studies, the substrate was added to the assay medium containing enzyme, buffer, and DTNB with inhibitor after incubation for 10 min. All experiments were carried out in duplicate and the results were expressed as means \pm SEM. The relative activity is expressed as the percentage ratio of enzyme activity in the absence of inhibitor.

Bioinformatics Analysis

The model was constructed with protein data obtained from the Protein Data Bank (PDB) [24]. All 128 *Leishmania* Proteins with known ligands (LPs), including both single proteins and protein complexes, were downloaded. Separation of the protein complexes yielded 624 single LPs in total (protein chains). The option known as ligand report was used to collect all Ligand-LP Interactions pairs (LLPIs) reported in the PDB. Only organic drugs and metabolites were considered. The final dataset contains 563 LLPIs, including 122 different ligands and 3,823 non-interacting Ligand-LPs pairs (nLLPIs). The nLLPIs are pairs formed between the 122 ligands and LPs that do not interact with them. The MARCH-INSIDE (MI) software was then used to calculate the values of spectral moments $\pi_k(L_m)$ and $\pi_k(P_w)$ for both ligands and LPs sequences, respectively [25]. These molecular descriptors were used as inputs to search for a linear model. The Linear Discriminant Analysis (LDA) method, implemented in STATISTICA version 6.0 (ST) [26], was used to develop a simple linear classifier with the following general formula:

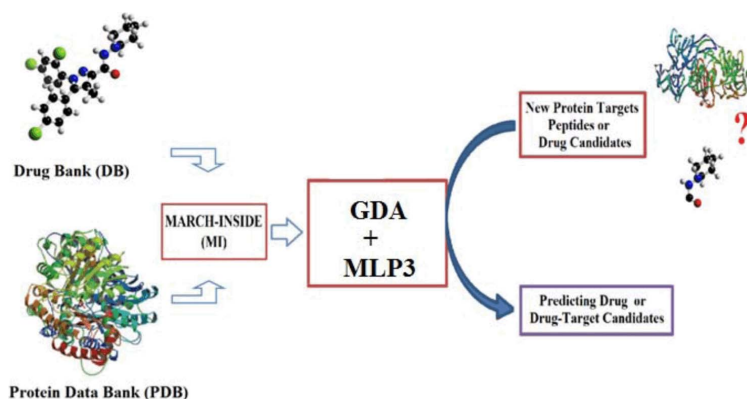


Figure 1. Diagram of the workflow used to develop and use the predictive method.

doi:10.1371/journal.pone.0077560.g001

$$S_{mm}(LLPI)_{pred} = \sum_{k=0}^5 a_k \cdot k \pi(L_m) + \sum_{k=0}^5 b_k \cdot k \pi(P_n) + c_0 \quad (1)$$

This equation has only two additive terms; however difference or interaction terms can also be used in non-linear analysis. The model deals with the classification of ligands into two sub-sets: with or without affinity against many different proteins expressed in the proteome of *Leishmania* sp. A dummy variable Ligand-*Leishmania* Protein Interaction ($LLPI_{mn}$) was used as input to codify the affinity. This variable indicates either high ($LLPI_{mn} = 1$) or low ($LLPI_{mn} = 0$) affinity of a given ligand L_m by different LPs P_n . The predicted score $S_{mm}(LLPI)_{pred}$ is the output and it is a continuous dimensionless score that classifies ligands from low to high affinity to the protein target. In the model, a_k , b_k , and c_0 represent the coefficients of the classification function. The statistical significance of the model was determined by calculating the p-value (p) with the Chi-square test. The specificity, sensitivity and total accuracy were also checked to determine the quality-of-fit to data in training. The canonical regression coefficient R_c was used to determine the strength of the linear correlation between the independent inputs (π_k) and dependent variable $LLPI_{mn}$. The model validation was corroborated with external prediction series. A diagram of the general workflow used to develop and apply this and other models is shown in Figure 1.

Results

In vitro Assays

Eighteen different oxoisoaporphine derivatives, **OXO 1–18** (Figure 2), were evaluated in vitro in axenic cultures of amastigotes of *L. amazonensis*, to test for possible antileishmanial activity. The inhibitory activity of these compounds was tested at several concentrations ranging from 0.05–50 µg/ml. The results showed that only **OXO 1** and **OXO 13** rendered maximal inhibition at the lowest concentration of 0.05 µg/ml (Table 1). These pharmacological results appear to indicate that although all tested compounds are chemically related structures, the presence of either a certain type of carbon framework or moieties are important for the in vitro anti-*Leishmania* activity of oxoisoaporhines.

Compounds **OXO 1** and **OXO 13** were then selected to determine the in vitro effectiveness against promastigotes of four species of *Leishmania* representative of the main clinical forms of the disease: *L. infantum* (as a model of visceral leishmaniasis) and *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. guyanensis* (as models of cutaneous or mucocutaneous forms). The cytotoxicity of both molecules against the J774.2 macrophage cell line was also tested. Both compounds displayed antileishmanial activity against the 4 species tested with the highest activity recorded against *L. guyanensis* (Table 2). Comparatively, compound **OXO 13** was the most active (IC_{50} lower than that recorded for the reference compound, miltefosine), but this compound also displayed a high degree of toxicity ($CC_{50} = 31.4$ µg/ml compared with 55.4 µg/ml for miltefosine). By contrast, compound **OXO 1** showed an intermediate level of activity against all *Leishmania* species, and it was not toxic for the J774.2 cell line. In order to simulate natural physiological conditions in the vertebrate host, the selected compounds were tested against intracellular amastigotes in a newly developed fluorometric assay using *L. infantum* and *L. amazonensis*. Both compounds displayed significant antileishmanial activity, relative to that of the reference drug, against both species.

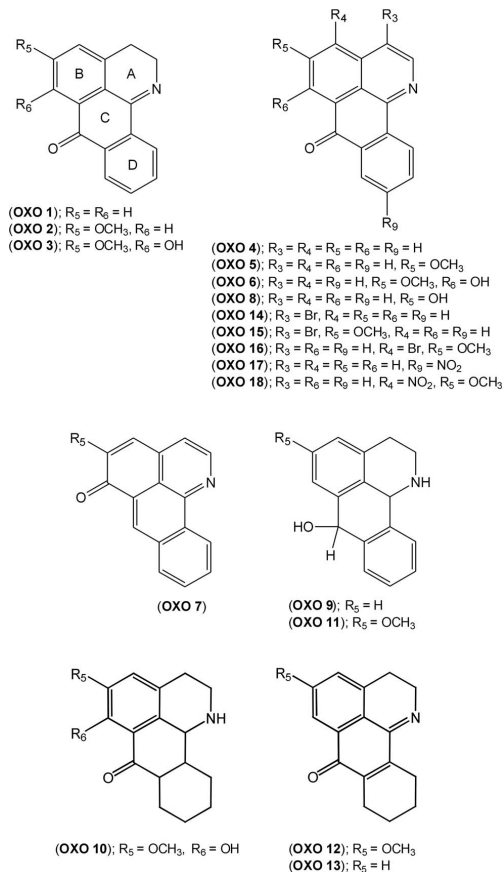


Figure 2. Chemical structures of oxoisoaporphine derivatives (OXO 1–18).

doi:10.1371/journal.pone.0077560.g002

OXO 13 was most active, almost 5 times as active as miltefosine (IC_{50} 4.49 ± 0.64 µg/ml and 4.83 ± 0.61 µg/ml versus 20.9 ± 1.47 µg/ml and 23.7 ± 1.78 µg/ml against *L. amazonensis* and *L. infantum*, respectively) (Table 3). Both products also exhibited good selectivity indexes in comparison with the reference drug.

In vivo Assays

Finally, both in vitro active compounds were tested in vivo in BALB/c mice infected with *L. infantum*. The results, expressed as mean values (number of parasites $\times 10^6$) \pm standard deviation (SD) of individual data, as assessed by limit dilution assay taken from two independent experiments, are shown in Table 4. Compound **OXO 13** was not effective, as the percentage reduction of *Leishmania* amastigotes in liver and spleen did not differ from that obtained for the untreated control. In contrast, compound **OXO 1** caused a significant reduction in the parasite burden in spleen and livers of treated mice (Table 4). The reduction of parasite with **OXO 1** in livers reached $99 \pm 2\%$

Table 1. In vitro assays of axenic amastigotes from *Leishmania amazonensis* with oxoisoporphine derivatives 1–18.

Compound	Inhibition (%) at concentrations tested				Leishmanicidal activity	
	50 µg/ml	5 µg/ml	0.5 µg/ml	0.05 µg/ml	IC ₉₀	IC ₅₀
OXO 1	107.8	107.4	105.7	100.6	<0.05	<0.05
OXO 2	93.9	84.8	0	0	16.4	0.2
OXO 3	98.1	70.8	0	2.00	19.5	5.5
OXO 4	97.5	20.3	10.1	2.3	31.1	4.9
OXO 5	65.5	0	1.0	3.6	134.6	40.9
OXO 6	100.0	88.8	15.2	7.9	9.7	1.5
OXO 7	103.4	94.7	58.6	10.3	3.6	0.34
OXO 8	98.9	87.4	5.4	3.0	12.8	2.6
OXO 9	98.0	7.3	15.9	3.9	31.1	13.3
OXO 10	101.5	23.8	10.7	2.8	19.5	3.8
OXO 11	100.8	0.1	1.7	1.0	29.438	15.2
OXO 12	101.1	101.8	14.1	8.5	2.3	0.5
OXO 13	106.9	103.2	108.0	106.7	<0.025	<0.025
OXO 14	95.2	0	0	2.0	19.9	10.4
OXO 15	95.7	0	2.3	0	19.8	10.8
OXO 16	88.0	0	4.1	1.7	27.0	13.3
OXO 17	98.3	0	0.5	0.5	18.2	10.6
OXO 18	103.3	99.4	0	0	1.6	0.8

IC₉₀: 90% inhibitory concentration, IC₅₀: 50% inhibitory concentration.
doi:10.1371/journal.pone.0077560.t001

($p < 0.05$) for a dose of 10 mg/kg, whereas the reduction for the same dose in spleens was slightly lower $78 \pm 33\%$ but also significant ($p < 0.05$). Considering the toxicity, relative to the reference drug miltefosine, which caused 12.5% mortality at a dose of 5 mg/kg, OXO 1 was not toxic, even at the maximal dose of 10 mg/kg.

Binding of Oxoisoporphine Compounds to MAO and AChE Enzymes

To investigate possible enzyme targets that may explain the different capacity of oxoisoporphine compounds to inhibit the growth of *Leishmania* parasites, we compared the ability of compounds OXO 1 and OXO 13 to inhibit the MAO and AChE enzymes. The enzymes were chosen on the basis of the results of previous studies, which showed that several molecules chemically related to oxoisoporphines display inhibitory activity against AChE and MAO-A [21,27,28]. The data in Table 5 show that both compounds were good inhibitors of MAO-A (data taken

from Prado-Prado et al. [21]) and display a significant degree of inhibitory activity against AChE; however, there were no differences in the inhibitory activity of these compounds against MAO-A or AChE enzymes.

Bioinformatic Analysis of Other Putative *Leishmania* Targets for Oxoisoporphine Compounds

Taking into consideration that the in vitro inhibition assays with the MAO and AChE enzymes did not indicate any differences between OXO 1 and OXO 13 compounds, we carried out a predictive study of putative targets among LPs. As there are no previous reports of any predictive method for drug-target interactions developed specifically for LPs, we developed a new model. The best LDA model found was as follows:

$$S_{mn}(LLPI)_{pred} = 0.50308 \cdot {}^5\pi(P_n) + 0.12527 \cdot {}^5\pi(L_m) - 4.82360 \quad (2)$$

$$N = 3294 \quad Rc = 0.7 \quad \chi^2 = 1964.436 \quad p < 0.001$$

Table 2. In vitro antileishmanial activity against promastigotes and cytotoxic activity of oxoisoporphine derivatives (OXO 1 and 13).

Compound	IC ₅₀ (µg/ml)				CC ₅₀ (µg/ml)
	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	J774.2
OXO 1	42.1±3.5	31.8±2.2	48.3±2.7	16.3±1.4	>100
OXO 13	4.4±0.2	3.6±0.3	4.4±0.2	1.8±0.1	31.4±3.2
Miltefosine	7.2±0.6	12.5±0.4	7.2±0.2	7.9±0.5	55.4±4.2

IC₅₀: 50% inhibitory concentration; CC₅₀: 50% cytotoxic concentration.
doi:10.1371/journal.pone.0077560.t002

Table 3. In vitro activity of selected compounds on intracellular amastigotes of *L. amazonensis* and *L. infantum*.

Compound	IC ₅₀ (μg/ml)		Selectivity Index ^a	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
OXO 1	20.6±1.2	56.4±3.8	>6	>3
OXO 13	4.5±0.6	4.83±0.6	6.99	6.5
Miltefosine	20.9±1.5	23.7±1.8	2.65	2.3

IC₅₀: 50% inhibitory concentration.^aSelectivity index: ratio between CC₅₀ (as recorded in Table 2) and IC₅₀.
doi:10.1371/journal.pone.0077560.t003

where N is the number of cases (LLPIs and nLLPIs) used to train the model. This model has a Rc = 0.7 and an accuracy of 95.2% in training and of 94.8% in external validation series (Table 6). These results indicate the development of an accurate model according to previous reports on the use of LDA in drug discovery [25]. Nonetheless, the LDA model is unbalanced because only correctly classified ≈ 70% of LLPIs and 98% of nLLPIs. Therefore, the Artificial Neural Network (ANN) module of ST was used to search for a non-linear model [26]. The best ANN model was a Multi Layer Perceptron with 3 layers of neurons (MLP3). The MLP3 classifier presented an overall Ac = 92.5% in both training and external validation series (Table 6). In contrast to the LDA model, the ANN model is not unbalanced and correctly classified ≈ 92% of both LLPIs and nLLPIs. In addition, the MLP3 model is highly accurate, as demonstrated by the Receiver Operating Curve analysis, with an area under curve of 0.95. Finally, both LDA and MLP3 were used to predict the possible LLPIs between the 624 LPs and the 18 compounds. The predicted s_{ij} scores for LLPIs are sensitivity-weighted averages of the probabilities with which the compound i^{th} interact with protein j^{th} as determined by both the first linear method $l1 = \text{LDA}$ and the first non-linear method $n11 = \text{MLP3}$. The values were calculated as follows: $s(\text{LLPI})_{ij} = \frac{1}{2} \cdot [\text{Sn}_{11} \cdot \text{p}_{\text{nnm}}(\text{LLPI})_{il} + \text{Sn}_{n11} \cdot \text{p}_{\text{nnm}}(\text{LLPI})_{nl}]$, where Sn_{11} and Sn_{n11} are the sensitivities in training of methods m_{11} and m_{n11} respectively. This takes into account the predictions of the best two models found in proportion to their sensitivities (Table 6). All these proteins are predicted by both LDA & MLP3 to undergo LLPIs with all oxoisoaporphine derivatives with average sensitivity-weighted probabilities >0.80. Both models predicted as potential targets four proteins present in members of the Trypanosomatidae family, which were two putative pteridine reductase 2 (PTR2) proteins described in *Trypanosoma cruzi* (1MXF and 1MXH), one N-myristoyltransferase (NMT) from *L. donovani* (2WUU), and one topoisomerase I from *L. donovani* (2B9S).

Discussion

In this study, we present data on novel oxoisoaporphines, some of which display either in vitro or in vivo antileishmanial activity. However, because only a limited number of compounds were active at low doses, the structural differences possibly related to the activity of this type of alkaloids are also discussed. Thus, the carbonyl group at C-7 and the 1,2-dihydro-isoquinoline system are common moieties in the active compounds OXO 1 and OXO 13, which may be relevant to the observed antileishmanial activity. Nevertheless, in the D ring of compound OXO 13, partial hydrogenation of the aromatic ring yields a cyclohexene that is not flat, so that this compound will interact differently from OXO 1. The in vivo assay data with the OXO 1 and OXO 13 compounds

Table 4. In vivo antileishmanial activity of compounds OXO 1 and OXO 13.

Compound	Dose (mg/kg)	Liver		Spleen	
		Mean	%Red	Mean	%Red
Control	–	29.5±8.5	–	466.8±105.1	–
OXO 1	2.5	3.3±7.0*	89±24	210.2±219.4	55±47
OXO 1	5	9.0±15.1	70±51	249.8±182.1	47±39
OXO 1	10	0.4±0.6*	99±2	103.0±154.0*	78±33
OXO 13^a	2.5	24.3±12.4	18±42	456.5±228.7	2±49
OXO 13^a	5	25.2±17.9	15±61	402.4±186.7	14±40
OXO 13	10	18.3±13.3	38±45	422.0±154.0	10±33
Miltefosine	2.5	20.5±14.2	31±48	200.7±224.1	57±48
Miltefosine	5 [†]	14.7±11.5	50±39	230.3±186.7	51±40

Reduction in parasite burden in spleens and livers of treated mice (8 animals/group), relative to untreated controls.

^aSix animals/group.[†]12.5% mortality.

*p<0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0077560.t004

showed a different ability to inhibit the growth of *Leishmania* amastigotes both in liver and in spleen of BALB/c mice. Thus, while OXO 1 showed a reduction in the parasite burden of almost 100% in liver and 78% in the spleen, OXO 13 did not show a significant inhibitory activity (Table 4). This indicates that the conservation of the iminoanthraquinone unit (20) in OXO 1 (Figure 3) may promote the leishmanicidal activity or a better bioavailability in the site of action than OXO 13.

Regarding possible target(s) for the antileishmanial activity of oxoisoaporphine compounds, it has been reported that this family of molecules is able to inhibit the MAO-A enzyme selectively [21]. However, as MAO-A has not been reported to be present in Trypanosomatids, and the inhibitory activity of these compounds against MAO-A was the inverse of their antileishmanial activity, this enzyme can probably be rejected as a target for antileishmanial

Table 5. Inhibitory effects of test drugs (75 μM) on the enzymatic activity of recombinant AChE expressed in HEK 293 cells, and IC₅₀ values for the inhibitory effects of test drugs (new compounds and reference inhibitors) on the enzymatic activity of human recombinant MAO isoforms expressed in baculovirus infected BTI insect cells.

Compound	AChE (μM) ^a	MAO-A ^b (IC ₅₀ , μM)	MAO-B ^b (IC ₅₀ , μM)
Rasagiline	82.5±4.3	ND	ND
Clorgyline	ND	0.0040±0.00025 ^c	63.41±1.2
Moclobemide	ND	361.38±19.4 ^c	>1000
OXO 1	26.2±5.6	27.32±1.18 ^c	>100
OXO 13	25.6±5.9	2.12±0.07 ^c	>50

All IC₅₀ values shown are the means ± SEM from five experiments.^aPercentage inhibition.^bValues for clorgyline, moclobemide, OXO 1 and OXO 13 were taken from Prado-Prado et al. (21).^cp<0.01 relative to the corresponding IC₅₀ values obtained against MAO-B, as determined by ANOVA/Dunnett's.

doi:10.1371/journal.pone.0077560.t005

Table 6. Results of LDA and ANN classification models.

Model	Profile	Data	Train			Validation			
			nLLPIs	LLPIs	%	Stat. ^a	%	nLLPIs	LLPIs
Linear	LDA 1	nLLPIs	2,826	45	98.4	Sp _{l1}	98.0	933	19
	2:2-1:1	LLPIs	113	310	73.3	Sn _{l1}	72.9	38	102
		Total			95.2	Ac _{l1}	94.8		
Non-Linear	MLP	nLLPIs	2,657	214	92.5	Sp _{nl1}	92.6	882	70
	14:14-9-1:1	LLPIs	32	391	92.4	Sn _{nl1}	91.4	12	128
		Total			92.5	Ac _{nl1}	92.5		

^aStat. are the statistical parameters of the models in both training and validation series: Sp, Sn, and Ac indicate Specificity, Sensitivity and Accuracy. In addition, the subscripts l and nl indicate whether the models are linear or non-linear and the number in the subscripts indicates the number of the model, so that: Sp_{l1}, Sn_{l1}, Ac_{l1}, and Sp_{nl1}, Sn_{nl1}, Ac_{nl1}, are the Specificities, Sensitivities, Accuracies of the first linear and non-linear models.

doi:10.1371/journal.pone.0077560.t006

activity.

In addition to MAOs, acetyl/butryl cholinesterases have also been reported to be inhibited by oxoisoaporphines and oxoaporphines [29]. Unlike for MAO-A, an AChE has been reported to be present in the glycosome of *T. evansi*, which might act by regulating the flow of Ca^{+2} between the organelle and the cytosol [30]. However, as with MAO-A, the present results (Table 5) showed that compounds OXO 1 and OXO 13 exerted only moderate inhibitory activity against AChE in comparison with the rasagiline used as a control, and more importantly, both compounds exerted similar inhibitory activity. Therefore, as with MAO-A, the *Leishmania* AChE also appears a highly unlikely target for the oxoisoaporphine compounds.

A bioinformatics model was developed to search the *Leishmania* proteome for alternative targets for the oxoisoaporphine compounds. Although a bioinformatics model based on neural networks cannot be expected to provide information about target proteins that could be selectively targeted by structurally related drugs, the proposed model may prove useful as a general model to identify proteins that merit investigation as targets for such compounds. As described in the above section, the model identified four proteins as highly likely putative targets, including

two putative PTR2 (IMXF and IMXH), one NMT (2WUU) and one topoisomerase I (2B9S).

Regarding IMXF and IMXH, reduced pteridines are known to be required for a number of important cellular functions. Unlike their mammalian hosts, trypanosomatid parasites are pteridine auxotrophs, and they salvage the precursor pteridines from the host to reduce them to the respective biologically active tetrahydro forms. In *Leishmania*, pteridine reductase 1 (PTR1), the primary enzyme for reducing pterins, is also responsible for resistance to antifolate drugs. Typically, PTR1 is more active with fully oxidized biopterin and folate than with their reduced counterparts. Other authors have identified an enzyme, TcPTR2 from *T. cruzi*, which, although very similar to PTR1 in its primary sequence, can only reduce dihydrobiopterin and dihydrofolate but not oxidized pteridines [31].

The NMT (2WUU) catalyses the attachment of myristate to the amino-terminal glycine residue of a subset of eukaryotic proteins that function in multiple cellular processes, including vesicular protein trafficking and signal transduction. *N*-myristoylation facilitates association of substrate proteins with membranes or hydrophobic domains of other partner peptides, which is essential for viability in all cell types tested to date. Previous studies have validated *L. donovani* NMT as a potential target for the development of new therapeutic agents against visceral leishmaniasis [32].

Finally, the type I topoisomerases, such as 2B9S, are essential enzymes that are responsible for relaxing superhelical tension in DNA [33]. Interestingly, topoisomerase I is a target for anti-cancer drugs such as camptothecin [34]. In addition, topoisomerase II has been reported to be inhibited by oxoaporphines (e.g. dicentrinone) that display potent inhibitory activity against *L. braziliensis* and *T. cruzi* [10].

In summary, we investigated for the first time the in vitro and in vivo activity of a group of novel oxoisoaporphine compounds, some of which display inhibitory activity against several *Leishmania* species. We have also developed a bioinformatics tool that may be useful for searching for new targets for antileishmanial drugs.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Haddad (Univ Toulouse, France) for providing us with the preliminary screening data shown in Table 1.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ESS MDA FBF HGD FMU. Performed the experiments: ESS PBR MDA MY. Analyzed the data: ESS PBR MDA MY VMS FBF HGD FMU. Contributed reagents/materials/analysis tools: EU LS HGD. Wrote the paper: ESS VMS FBF HGD FMU.

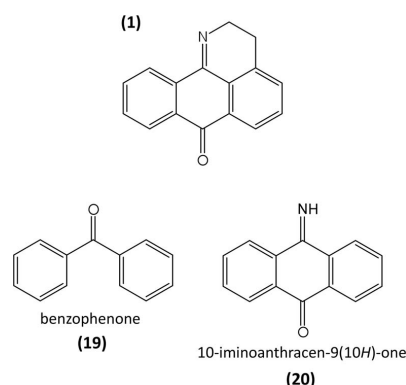


Figure 3. Structural comparison between benzophenone (19) and iminoanthraquinone (20) and the oxoisoaporphine scaffold (1).

doi:10.1371/journal.pone.0077560.g003

References

- Pearson RD, Sousa AQ (1996) Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect Dis 22: 1–13.
- den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J (2011) Leishmaniasis impact and treatment access. Clin Microbiol Infect 17: 1471–1477.
- da Silva SM, Amorim IF, Ribeiro RR, Azevedo EG, Demicheli C, et al. (2012) Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother 56: 2858–2867.
- Castillo E, Dea-Ayuela MA, Bolás-Fernández F, Rangel M, González-Rosende ME (2010) The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. Curr Med Chem 17: 4027–4051.
- Chen ZF, Liu YC, Peng Y, Hong X, Wang HH, et al. (2012) Synthesis, characterization, and in vitro antitumor properties of gold(III) compounds with the traditional Chinese medicine (TCM) active ingredient lirioidenine. J Biol Inorg Chem 17: 247–261.
- Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM (2001) Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat Prod Rep 18: 674–688.
- Camacho M, Kirby GC, Warhurst AD, Croft SL, Phillipson JD (2000) Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. Plant Med 66: 478–480.
- Costa EV, Pinheiro ML, Xavier CM, Silva JR, Amaral AC, et al. (2006) A pyrimidine-beta-carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. J Nat Prod 69: 292–294.
- Waechter AI, Cavé A, Hocquemiller R, Bories C, Muñoz V et al. (1999) Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unolopsis buchtienii*. Phytother Res 13: 175–177.
- da Silva DB, Tulli ECO, Militão GCG, Costa-Lotufo LV, Pessoa C, et al. (2009) The antitumor, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. Phytomedicine 16: 1059–1063.
- Fabre JL, Farge D, James C (1978) Dibenz[de,h]quinoline derivatives. US patent # 4,128,650 Dec 5.
- Sobarzo-Sánchez E, Cassels BK, Castedo L (2003) An expedient synthesis of unusual oxoisoaporphine and annelated quinoline derivatives. Synlett 11: 1647–1650.
- Sobarzo-Sánchez E, De la Fuente J, Castedo L (2005) Synthesis and total assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of new oxoisoaporphines by long-range heteronuclear correlations. Magn Reson Chem 43: 1080–1083.
- Estevez Y, Castillo D, Jangoo M, Arevalo J, Rojas R, et al. (2007) Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian chayahuista ethnic group. J Ethnopharmacol 114: 254–259.
- Sereno D, Lemesre JL (1997) Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. Parasitol Res 83: 401–403.
- Bilbao-Ramos P, Sifontes-Rodríguez S, Dea-Ayuela MA, Bolás-Fernández F (2012) A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular *Leishmania* amastigotes. J Microbiol Methods 89: 8–11.
- Bilbao-Ramos P, Galiana-Roselló C, Dea-Ayuela MA, González-Alvarez M, Vega C, et al. (2012) Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities. Parasitol Int 61: 604–613.
- Dea-Ayuela MA, Castillo E, Gonzalez-Alvarez M, Vega C, Rolón M, et al. (2009) In vivo and in vitro anti-leishmanial activities of 4-nitro-N-pyrimidin- and N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and N2-(4-nitrophenyl)-N1-propylglycinamide. Bioorg Med Chem 17: 7449–7456.
- Hill JO, North RJ, Collins FM (1983) Advantages of measuring changes in the number of viable parasites in murine models of experimental cutaneous leishmaniasis. Infect Immun 39: 1087–1094.
- Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. Parasite Immunol 7: 545–555.
- Prado-Prado F, García-Mera X, Escobar M, Sobarzo-Sánchez E, Yáñez M, et al. (2011) 2D MI-DRAGON: a new predictor for protein-ligands interactions and theoretic-experimental studies of US FDA drug-target network, oxoisoaporphine inhibitors for MAO-A and human parasite proteins. Eur J Med Chem 46: 5838–5851.
- Yáñez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F (2006) Inhibitory effects of cis- and trans-veratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. Biochem Biophys Res Commun 344: 688–695.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7: 88–95.
- Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF Jr, Brice MD, et al. (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. J Mol Biol 112: 535–542.
- González-Díaz H, Prado-Prado F, Ubeira FM (2008) Predicting antimicrobial drugs and targets with the MARCH-INSIDE approach. Curr Top Med Chem 8: 1676–1690.
- Hill T, Lewicki P (2006) Statistics: Methods and applications: a comprehensive reference for science, industry, and data mining. Tulsa: StatSoft Inc.
- Tang H, Zhao HT, Zhong SM, Wang ZY, Chen ZF et al. (2012) Novel oxoisoaporphine-based inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation. Bioorg Med Chem Lett 22: 2257–2261.
- Tang H, Zhao LZ, Zhao HT, Huang SL, Zhong SM, et al. (2011) Hybrids of oxoisoaporphine-tacrine congeners: novel acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced β -amyloid aggregation inhibitors. Eur J Med Chem 46: 4970–4979.
- Tang H, Wei YB, Zhang C, Ning FX, Qiao W, et al. (2009) Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of oxoisoaporphine and oxoaporphine derivatives as new dual inhibitors of acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase. Eur J Med Chem 44: 2523–2532.
- Mijares A, Concepción JL, Vielma JR, Portillo R (2011) Immune detection of acetylcholinesterase in subcellular compartments of *Trypanosoma evansi*. Parasitol Res 108: 1–5.
- Schormann N, Pal B, Senkovich O, Carson M, Howard A, et al. (2005) Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* pteridine reductase 2 in complex with a substrate and an inhibitor. J Struct Biol 152: 64–75.
- Brannigan JA, Smith BA, Yu Z, Brzozowski AM, Hodgkinson MR, et al. (2010) N-myristoyltransferase from *Leishmania donovani*: structural and functional characterisation of a potential drug target for visceral leishmaniasis. J Mol Biol 396: 983–999.
- Davies DR, Mushtaq A, Interthal H, Champoux JJ, Hol WG (2006) The structure of the transition state of the heterodimeric topoisomerase I of *Leishmania donovani* as a vanadate complex with nicked DNA. J Mol Biol 357: 1202–1210.
- Zhou BN, Johnson RK, Mattern MR, Wang X, Hecht SM, et al. (2000) Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucosylon*. J Nat Prod 63: 217–221.